



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“GUÍA EN PRESENTACIONES INTERACTIVAS
DE POWERPOINT COMO MATERIAL DE APOYO
PARA EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA
DIAGNÓSTICA, DIRIGIDO A LOS ALUMNOS
QUE CURSAN LA CARRERA DE BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

XARENI HERNÁNDEZ CARMONA

ASESOR: Q.F.B. DULCE MARÍA RUVALCABA SIL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

*“Un guerrero de la luz nunca olvida la gratitud.
Durante la lucha, fue ayudado por los ángeles; las fuerzas celestiales colocaron cada
cosa en su lugar, y permitieron que pudiera dar lo mejor de sí.”*

P. Coelho

El primer lugar lo tiene la mujer sin la cual todo del ahora, sería nada. Mi madre María Marcelina Hernández, la persona que me ha acompañado en este maravilloso camino, la que me ha brindado las mejores enseñanzas y sustentos para poder salir siempre adelante. A ella además de agradecerle lo principal que es la vida, agradezco también esas tardes de parque, el chileatole más delicioso que he probado, los cuidados más minuciosos y amorosos que solo las madres saben brindar, esos abrazos confortables en los que la derrota se hace presente, salir a correr por la mañanas, las tardes de compras, pastelitos y helados, y los paseos interminables en las calles del Centro Histórico entre muchos otros memorables momentos.

A mis padrinos Jorge y Lucy, personas llenas de sabiduría y fortaleza de las cuales he aprendido que la fuerza más grande es la unión y que en una familia nunca debe faltar el apoyo. A sus hijos Itzel y Eugenio y a los pequeños Adriel, Isis y Amanda, que siempre me recuerdan características que no debo olvidar como los son el valor, la alegría y la inocencia. A todos ellos debo muchas enseñanzas, apoyo, cariño, confianza, hermosos festejos de cumpleaños, muchos momentos de alegría y llenos de risas, pero sobre todo el poder comprobar que la familia no es únicamente la biológica.

A mi asesora la QFB. Dulce María Ruvalcaba Jil, por su apoyo en la dirección, asesoría y realización de esta tesis. Así como a las profesoras Andrea Becerril, Guadalupe Avilés, Verónica Ruiz y Heidi Amezcua por sus opiniones para enriquecer mi trabajo.

A mi novio Omar ya que todo el tiempo me demuestras que eres capaz de ir al fin del mundo a mi lado. Gracias por acompañarme, reír, bailar, comer y disfrutar siempre juntos.

A la tía Cari por esa capacidad de brindar tanto amor en una comida, y a su hermosa familia que nunca deja de sorprenderme tío José, Silvia y José Luis, los quiero mucho.

A mis amigos queridos Viridiana Miranda, Miguel Ángel Ramírez, Maribel Cruz, Jobani Calvillo, Janet Romero, Vanessa Mayen, Juana Galicia y Juan Luis Figueroa, ya que con cada uno de ellos he compartido momentos invaluableles.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, motivo de orgullo. Por abrirme sus puertas y así poder desarrollarme como profesionista. Gracias a ella siempre voy generando más frutos en la vida.

Y por último y no por eso menos importantes, mi familia pelo, pico y pata, que con un solo gesto de cariño son capaces de cambiarle el rumbo a mis días.

ÍNDICE

Prólogo	1
Introducción	2
Tipos de muestras	2
Transporte de las muestras	2
Análisis microscópico	3
Cultivos	4
Identificación	5
Objetivo General	7
Práctica 1. Monitoreo Ambiental	8
Objetivo	9
Introducción	9
Diagrama de Trabajo	11
Práctica 2. Control de Calidad para Medios de Cultivo	12
Objetivo	13
Introducción	13
Clasificación según su función y uso	13
Control de Calidad de los medios de cultivo	14
Pruebas de promoción de crecimiento	14
Diagramas de trabajo	
Porcentaje de recuperación	16
Pruebas de Promoción e Inhibición de crecimiento y Esterilidad	17
Control de Calidad en Pruebas Bioquímicas	17
Prueba de CAMP	18
Evaluación de Taxos	19
Practica 3. Análisis Microbiológico de Agua	20
Objetivo	21
Introducción	21
Recuento de microorganismos mesófilos aerobios	22
Determinación del Número mas Probable	22
Filtración por membrana	23
Readycult	23
Diagrama de Trabajo	25
Diagrama Readycult	26

Práctica 4. Coprocultivo	27
Objetivo	28
Introducción	28
Coprocultivo	29
Tabla. Enterobacterias, cuadro clínico y características morfológicas coloniales.....	30
Diagrama de trabajo	32
Tabla. Características bioquímicas	33
Práctica 5. <i>Vibrio cholerae</i>	34
Objetivo.....	35
Introducción	35
Diagnóstico.....	36
Tabla. Características bioquímicas	37
Diagrama de trabajo.....	38
Práctica 6. Urocultivo	39
Objetivo	40
Introducción	40
Diagnóstico Presuntivo	41
Diagnóstico por cultivo	41
Diagrama de trabajo	43
Práctica 7. Microestandarizados	44
Objetivo	45
Introducción	45
Sistemas de identificación de determinaciones múltiples.....	45
API 20E	45
Sistema ID Crystal.....	46
Sistema MicroScan	46
Sistema Vitek	47
Diagrama de trabajo	48
Práctica 8. Exudado Faríngeo	49
Objetivo	50
Introducción	50
<i>Streptococcus pyogenes</i> del grupo A	50
<i>Streptococcus</i> β -hemolíticos (grupos C y G).....	51
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	51
<i>Staphylococcus aureus</i>	52
<i>Haemophilus</i>	52
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	52

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	53
<i>Moraxella</i>	53
Diagrama de trabajo.....	54
Práctica 9. Mycobacterium	55
Objetivo.....	56
Introducción.....	56
Pretratamiento de las muestras	56
Diagnóstico.....	57
Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes	57
Prueba de la tuberculina.....	58
Uso de instrumentos automatizados.....	59
Diagrama de trabajo.....	60
Práctica 10. Exudado Vaginal/Uretral	61
Objetivo	62
Introducción	62
Vaginitis.....	62
Vaginosis bacteriana	62
Cervicitis mucopurulenta	63
Epididimitis.....	63
Prostatitis.....	63
Sífilis o Chancro duro	64
Chancroide o Chancro blando.....	64
Linfogranuloma venéreo	64
Diagnóstico.....	64
Recomendaciones previas a la toma de muestra del tracto genital femenino	64
Exudado vaginal	65
Exudado uretral	65
Diagrama de trabajo.....	67
Práctica 11. Hemocultivo	68
Objetivo	69
Introducción.....	69
Meningitis bacteriana	69
Fiebre tifoidea	69
Brucelosis.....	70
Leptospirosis	70
Aspectos a considerar para un hemocultivo.....	70
Sistemas de procesamiento de hemocultivo	71
Sistemas manuales.....	71
Sistemas de Hemocultivo por lisis y centrifugación	72

Sistemas automatizados e informatizados.....	72
Otros líquidos corporales estériles que se pueden manejar como un hemocultivo	73
Diagrama de trabajo.....	74
Práctica 12. Heridas.....	75
Objetivo.....	76
Introducción.....	76
Clostridios	76
Bacillus.....	76
Bacteroides.....	77
Prevotella	77
Fusobacterium.....	77
Tabla. Heridas. Agentes etiológicos y toma de muestra	78
Diagnóstico	80
Infecciones oculares.....	80
Conjuntivitis.....	80
Queratitis	81
Endoftalmitis.....	81
Diagnóstico	81
Infecciones del oído	81
Otitis externa.....	81
Otitis media aguda.....	81
Ostomastoiditis aguda	82
Diagnóstico.....	82
Diagrama de trabajo.....	83
ANEXO	
Cuadros de identificación	84
Bacterias grampositivas.....	85
Bacterias gramnegativas	86
Referencias	87

PRÓLOGO

La presente guía constituye un material de apoyo al desarrollo del programa de laboratorio de la asignatura de Bacteriológica Diagnóstica y está constituida por 12 temas: Monitoreo Ambiental, Control de Calidad para medios de cultivo, Análisis de agua, Coprocultivo, *Vibrio cholerae*, Urocultivo, Microestandarizados, Exudado faríngeo, *Mycobacterium*, Exudado cérvico-vaginal/ Uretral, Hemocultivo y Heridas.

La Guía en presentaciones interactivas no es un Manual, ha sido elaborada como un material educativo para reforzar el conocimiento y las habilidades, así como orientar al alumno en el diagnóstico bacteriológico.

Se explican paso a paso, como deben realizarse cada uno de los métodos y técnicas utilizadas por los docentes para enseñar de forma práctica y didáctica, mediante el uso de presentaciones en PowerPoint, cuyos diagramas de trabajo animados, fotografías e imágenes muestran información y características de los diferentes agentes patógenos que pueden ser aislados en muestras biológicas, dichos estudios clínicos y ciertos microorganismos conforman el programa de la asignatura de Bacteriología Diagnóstica.

Todos los temas desarrollados en las presentaciones tienen como fin hacer las explicaciones de los mismos, más amenas y comprensibles para el alumno. Es una guía de consulta idónea tanto para la docencia como en el ámbito laboral.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de una infección bacteriológica empieza con una evaluación de las características clínicas y epidemiológicas, por lo general incluye la localización anatómica de la infección, la cual sugiere cierto número de agentes etiológico posibles.

TIPOS DE MUESTRAS

Muestras directas de tejido o líquido. Se recolectan a partir de tejidos y líquidos corporales normalmente estériles. Los métodos varían desde la punción- aspiración con aguja de un absceso hasta la biopsia quirúrgica.

Muestras indirectas. Son especímenes de exudados inflamatorios que han pasado por sitios que se sabe están colonizados por flora normal.

Muestras de sitio con flora normal. A menudo, el sitio principal de infección se encuentran en un área que se sabe se encuentra colonizada con una diversidad de microorganismos. De tal modo se deben realizar análisis selectivos para detectar microorganismos que se sabe producen infecciones. Por ejemplo enterobacterias como *Salmonella* o *Shigella* se pueden aislar de manera selectiva de una muestra de heces.

Es muy importante que la muestra obtenida tenga una contaminación mínima con microorganismos pertenecientes a la microbiota normal, esto puede conseguirse si se utilizan los procedimientos técnicos apropiados.

TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

El objetivo del transporte es mantener la muestra en condiciones lo más parecidas posible al momento de la toma. Debe ser rápido evitando calor y frío excesivos, cambios de presión o desecación. Es necesario que el contenedor esté protegido para evitar accidentes. El tiempo de envío no debe exceder de 30 minutos. En general las muestras se pueden conservar de 4-8°C.

Las muestras microbiológicas pueden transportarse al laboratorio por varios procedimientos, por ejemplo, ciertas muestras deben ser transportadas en un medio que preserve los microorganismos y ayude a mantener la proporción de unos con otros.

Los medios de transporte no son medios de cultivo, dado que su propósito es la conservación de la muestra para su estudio microbiológico. Estos evitan la multiplicación de los microorganismo existentes en la muestra y simultáneamente impiden que bacterias más delicadas (*Neisseria gonorrhoeae*) pierdan su viabilidad. En general son medios líquidos o semisólidos tamponados que contienen un mínimo de nutrientes y que están diseñados para evitar la desecación, mantienen un pH neutro y minimizan el crecimiento de contaminantes bacterianos, es posible que necesiten otras

características, como una atmósfera libre de oxígeno para los anaerobios estrictos. Existen diversos medios de transporte, según el tipo de microorganismo a investigar (Stuart, Amies, Cary-Blair o Tioglicolato).

Cuando se sospecha la existencia de anaerobios y la muestra se aspira con jeringa, lo mejor es retirar la aguja, tapar la jeringa con el tapón original y llevar la muestra al laboratorio sin prolongarse más allá de 10 minutos en caso contrario, es necesario inocular la muestra en tubos estériles con tapón de rosca o en tubo o vial estéril para anaerobios.

El transporte de las muestras de orina debe hacerse en frasco estéril y no debe transcurrir más de una hora entre el momento de la obtención de la muestra y su examen, de no ser posible la muestra debe refrigerarse.

Por otro lado algunas bacterias sobreviven e incluso pueden proliferar después de recolectada la muestra lo que puede comprometer la interpretación de los resultados obtenidos e interferir con el aislamiento de microorganismos más delicados.

ANALISIS MICROSCOPICO

El análisis directo de preparaciones de preparaciones teñidas o sin pigmentación por medio de la microscopía óptica es de particular utilidad para la detección de bacterias.

Existe una variedad de tinciones, los dos métodos más utilizados son la Tinción de Gram y la acido-alcohol resistente.

Tinción de Gram. El procedimiento implica la tinción de las células con cristal violeta seguido por la aplicación de una solución de yodo en yoduro, lo cual produce una acción mordiente en la que se forman complejos insolubles con las proteínas dentro de la célula con una coloración morada.

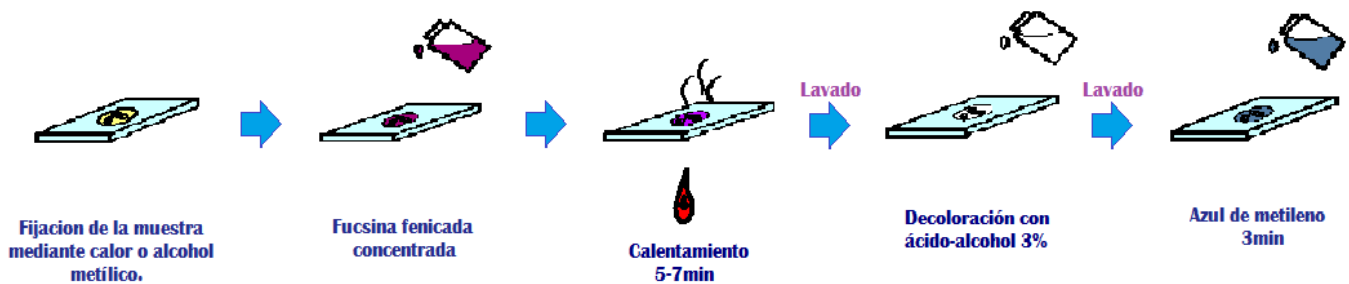
La diferencia entre bacterias grampositivas y gramnegativas se encuentra en la permeabilidad de la pared celular ante estos complejos al tratarse con mezclas de alcohol-cetona, esto extrae los complejos morados de las células gramnegativas, mientras que las bacterias grampositivas los retienen. Este procedimiento finaliza con una tinción de contraste con Safranina.

En muchas infecciones bacterianas, los microorganismos causantes pueden verse con facilidad tiñendo los frotis de la muestra (pus o líquido), las bacterias moradas o rojas se observan contra un fondo de leucocitos y sedimento que en combinación con los hallazgos clínicos, puede guiar el diagnóstico.



Tinción ácido-alcohol resistente. La acidorresistencia es una propiedad de bacterias como las micobacterias las cuales se colorean de manera inadecuada con pigmentos que se utilizan en la tinción de Gram. Es posible teñirlos mediante la aplicación de colorantes más concentrados, agentes penetrantes o mediante tratamiento con calor, pero una vez teñidas resisten la decoloración con ácido y etanol. Esto se relaciona con el alto contenido de lípidos de su pared celular.

En el procedimiento el frotis se inunda con carbol fucsina y se decolora con ácido clorhídrico en alcohol. Su tinción de contraste se realiza con azul de metileno por lo que los microorganismos aparecen rojos en fondo azul.



Una variante es la Tinción con Fluorocromos la cual utiliza un pigmento fluorescente (auramina o una mezcla de auramina-rodamina) seguida de la decoloración con ácido-alcohol, finalizando con una tinción de contraste con permanganato de potasio. Las bacterias teñidas con fluorocromos son amarillo brillantes (rodamina) o rojo anaranjadas (rodamina) contra un fondo oscuro.

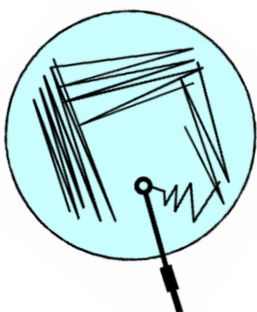
CULTIVOS

El aislamiento e identificación del agente infectante *in vitro* el método más sensible y específico de diagnóstico y por ende el más comúnmente utilizado.

La mayoría de las bacterias pueden cultivarse en una variedad de medios artificiales, pero en el caso de microorganismos como *Chlamydia*, por ser intracelulares estrictos solo pueden ser aislados en cultivos celulares.

Aislamiento e Identificación

Los medios bacteriológicos son preparados a partir de digeridos de proteínas animales o vegetales suplementados con nutrientes como glucosa, extracto de levadura o sangre para satisfacer los requerimientos nutricionales de los microorganismos.



La propagación en medios líquidos es evidente cuando el número de bacterias es suficiente para producir turbidez o conglomerados macroscópicos. La adición de un agente gelificante (polisacarido que se extrae de algas marinas) a un caldo de cultivo permite su preparación en sólido el cual se puede colocar en placas

Petri. Esto es conveniente debido a que se licua cerca de 95°C, retornando a su estado hasta que baja su temperatura a menos de 50°C, permitiendo añadir sustancias lábiles antes de que gelifique.

Una útil característica de las placas de agar es que las bacterias pueden separarse al extender una pequeña asada del espécimen sobre su superficie, las bacterias crecen en colonias aisladas después de incubarse. Estas colonias varían en cuanto a su morfología colonial: tamaño, forma, textura, color y otras características.

Existen métodos que no dependen de los cambios visuales en el medio de cultivo o en la formación de colonias para detectar la proliferación bacteriana en un cultivo, esto incluye cambios ópticos, químicos y eléctricos que se producen en el medio a causa del crecimiento bacteriano o de sus productos metabólicos. Muchos de estos métodos son más sensibles que las técnicas clásicas pudiendo detectar la proliferación en horas, por ejemplo un sistema totalmente automatizado que detecta el metabolismo bacteriano por fluorometría puede llevar a cabo una identificación bacteriana y una prueba de susceptibilidad antimicrobiana de dos a cuatro horas.

Condiciones atmosféricas

Aeróbicas. Una vez inoculados los cultivos de la mayoría de las bacterias se colocan en incubación con una temperatura entre 35 y 37°C. La mayoría de las bacterias crecen en el aire; sin embargo algunas requieren CO₂ y el mismo compuesto potencia el crecimiento de otras.

El método más sencillo es el frasco con vela, en el que se deja una vela prendida hasta consumirse en un frasco sellado que contiene las placas. Este método añade 1 a 2% de CO₂ a la atmósfera.

Anaeróbica. La mayoría de las bacterias anaerobias estrictas de importancia médica crecen en las profundidades de medios líquidos o semisólidos que contienen cualquier variedad de agentes reductores como cisteína, tioglicolato, ácido ascórbico o incluso limaduras de Hierro. Es posible lograr un ambiente anaeróbico al remplazar el aire con una mezcla de gases que contenga Hidrógeno, CO₂ y Nitrógeno.

IDENTIFICACIÓN

Una vez que se detecta crecimiento bacteriano se procede a un proceso de identificación, el cual implica métodos para la obtención de cultivos puros de colonias aisladas, seguido de pruebas diseñadas para la caracterización e identificación del microorganismo aislado. Los análisis y sus secuencias varían según su nivel taxonómico (género, especie, subespecie, etc).

Característica en Medio de Cultivo. Estas incluyen el manifiesto de propiedades de los microorganismos como requisitos nutricionales, producción de pigmento y capacidad para crecer en presencia de ciertas sustancias (NaCl, Bilis) o en ciertos medios (Agar MacConkey), también se utiliza un análisis de la capacidad de desarrollo a ciertas temperaturas o su capacidad hemolítica.

Características Bioquímicas. La capacidad de utilizar diversos sustratos o de producir metabolitos particulares es de suma utilidad en la identificación bacteriana.

Las pruebas bioquímicas se analizan por referencia que muestra los patrones de reacción característicos de las diversas especies bacterianas. Los avances en el análisis computarizado, utilizan los mismos principios bioquímicos junto con bases de datos computarizadas a fin de determinar la identificación más probable a partir de los patrones de prueba observados.

Estructura antigénica. Las bacterias poseen muchos antígenos como polisacáridos capsulares, proteínas superficiales y componentes de la pared celular. La serología implica el uso de anticuerpos específicos para detectar a los antígenos presentes en el microorganismo.

Objetivo general

Elaborar una serie de presentaciones interactivas en PowerPoint mostrando el proceso de diferentes tipos de muestras bacteriológicas de acuerdo a las prácticas establecidas en el programa de la asignatura de Bacteriología Diagnóstica de la carrera de Bioquímica Diagnóstica para orientar al alumno en su trabajo práctico.

The background of the entire page is a repeating pattern of various green cartoon microbes. These microbes have different shapes, some with multiple eyes, antennae, or legs, and some with different facial expressions. They are scattered across the page, creating a dense, playful texture.

MONITOREO AMBIENTAL

■ Objetivo

Establecer un monitoreo microbiológico en el personal y las áreas de trabajo, para conocer las características ambientales, demostrando así que éstas cuentan con las condiciones para el desarrollo de las diferentes actividades a realizar y realinear las medidas necesarias.

INTRODUCCIÓN

Para controlar el ambiente deben efectuarse pruebas que implican el recuento de partículas viables y no viables suspendidas en el aire o posadas sobre las superficies en el lugar de trabajo. Para establecer en forma óptima los resultados esperados, se utiliza un recuento basal, que se determina promediando numerosos recuentos cuando el proceso opera bajo condiciones controladas.

El procedimiento de un monitoreo ambiental consta de:

- Planificación de lugares a muestrear
- Toma de muestra
- Criterios de aceptación o rechazo
- Acciones correctivas en caso de desvío de los límites establecidos.

El programa de muestreo debe incluir la determinación cuantitativa de microorganismos presentes en el ambiente, el cual es un recuento total p.ej. bacterias y hongos; y la determinación cualitativa de microorganismos patógenos u objetables, dependiendo de los ensayos que realice el laboratorio.

Por lo general las pruebas usadas miden partículas en un volumen de aire muestreado o bien las partículas que se posan o están presentes en las superficies. Existen dos métodos para el control de carga microbiana en el aire:

- Método pasivo (por sedimentación)
- Método activo (por impacto)

Un contador electrónico detectara todas las partículas en un determinado volumen de aire al instante. Debido a la necesidad de controlar el nivel de microorganismos en el ambiente es necesario detectar la presencia de partículas viables las cuales son detectadas como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) después de un periodo de incubación p.ej. 48 horas a 30-35°C.

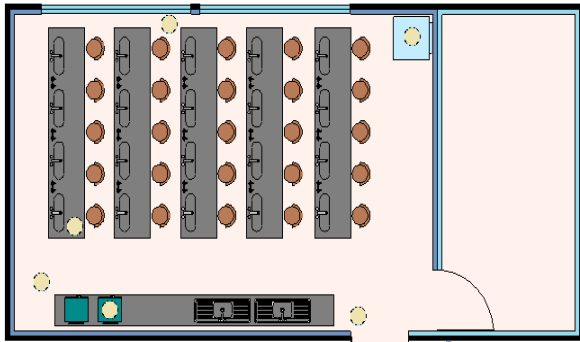
Los sitios para la obtención de muestras deben planificarse de forma que revelen niveles de contaminación que podrían resultar críticos en el control del ambiente (vestuarios, sitios de mucho tránsito de ingreso y egreso de áreas, sitios cercanos a la entrada y salida del sistema de aire).

Para obtener un recuento de microorganismos en un volumen de aire medido se usan varios aparatos para muestreo de aire. El muestreador con ranura sobre agar impulsa por vacío un volumen de aire medido a través de una abertura estrecha, lo que hace que el aire impacte sobre la superficie de una placa de agar nutritivo y crecen para dar colonias viables contadas como UFC. Un muestreador centrífugo, envía aire dentro por medio de un impulsor rotatorio y tira el aire mediante acción centrífuga contra una cinta periférica de agar nutritivo, con la ventaja en la facilidad de su limpieza y que es portátil.

El número de microorganismos presentes sobre las superficies puede determinarse mediante placas de agar con superficie convexa, con estas es posible hacer rodar la superficie elevada del agar contra las superficies planas o irregulares a probar. Este método también puede usarse para evaluar la cantidad de microorganismos presentes sobre la superficie del uniforme de los operadores, cada vez que se utilice este método habrá que tener cuidado de retirar todos los restos de agar que queden sobre la superficie probada.

Los resultados de las pruebas precedentes, que estarán disponibles dos días después de la toma de muestra son de mucha utilidad para mantener informado al personal de limpieza, producción y control de calidad acerca del nivel de contaminación de un área dada y por lo tanto comparando con los recuentos basales, indicara si es necesaria una limpieza más extensa y desinfección. Los resultados también son útiles para detectar fallas en el equipo de purificación del aire o la presencia de personal que pudiera diseminar gran cantidad de bacterias sin evidencia de signo físico de enfermedad.

La frecuencia con la cual se realiza el monitoreo ambiental debe ser establecida por cada laboratorio teniendo en cuenta la frecuencia y uso de sus áreas.



Monitoreo de Aire

Colocar placas de exposición de Agar Soya Trypticaseina y Agra Dextrosa Sabouraud, en diferentes lugares.

Dejarlas durante 30 minutos.

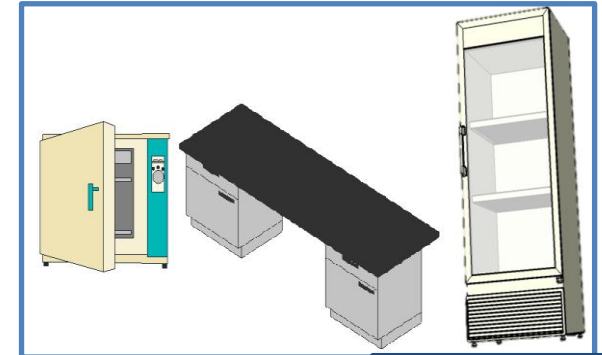


Personal

*Muestrear por medio de hisopado: manos antes y después de lavado.

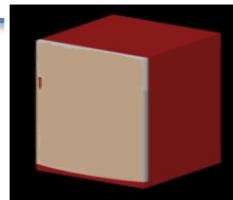
*Cabello

*Hablando con y sin cubrebocas.



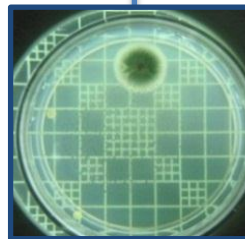
Superficies

Se puede realizar con ayuda de hisopos o utilizando placas de contacto.



Incubar las placas expuestas en un rango de temperatura de 30-35°C/ 2 días para las placas de AST y de 20-25°C/ 5 días las de ADS.

Realizar el conteo bacteriano y de hongos, junto con la descripción colonial correspondiente.



Dependiendo el número de UFC.

Hacer una resiembra de las diferentes colonias halladas, incubar 30-35°C/24 hrs.

Realizar tinción de Gram para descripción microscópica.

Determinar Género.



DIAGRAMA DE TRABAJO

Control de Calidad para Medios de Cultivo



■ Objetivo

Realizar diferentes pruebas como control de calidad para comprobar que los diferentes medios de cultivo utilizados dentro del laboratorio cumplen con las especificaciones necesarias para la promoción y aislamiento de los microorganismos a diagnosticar.

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es una herramienta con la cual se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos, así como efectuar pruebas de susceptibilidad.

Composición de los medios de cultivo:

- Base amina nitrógeno: peptona, proteína hidrolizada, infusión o extracto de proteína.
- Factores de crecimiento suplementarios: sangre, suero, extracto de levadura, nucleótidos, vitaminas.
- Fuentes de energía: alcoholes o carbohidratos complejos. Se agregan para realzar los cambios de pH.
- Sales amortiguadoras: fosfatos, acetatos, citratos. Suelen agregarse a las formulaciones con grandes cantidades de carbohidratos para prevenir los cambios excesivos de pH.
- Sales minerales y metales como: fosfatos, sulfatos, Ca^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , trazas de metales.
- Agentes selectivos: sustancias químicas, antibióticos y algunos colorantes. Se agregan en una concentración necesaria para inhibir agentes patógenos indeseables permitiendo la multiplicación de microorganismos seleccionados.
- Colorantes indicadores: rojo de fenol, rojo neutro, púrpura de bromocresol. Estos muestran los cambios posteriores a la fermentación, descarboxilación o desaminación en el pH.
- Agentes de gelificación: agar, gelatina, alginato, gel de sílice.

Clasificación según su función y uso:

Medios de enriquecimiento. Contienen nutrientes específicos requeridos para el crecimiento de determinadas bacterias que pueden estar presentes solas o con otras especies en la muestra de un paciente. Este tipo de medios se utiliza para favorecer el desarrollo de un microorganismo determinado mediante el uso de un nutriente específico.

Medios nutritivos. Contienen nutrientes que favorecen el desarrollo de la mayoría de los microorganismos sin requerimientos especiales de cultivo, sin promover de manera especial el crecimiento de alguno en particular.

Medios selectivos. Contienen uno o más agentes que inhiben a la mayoría de los microorganismos, es decir, promueven el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el de otras. Los agentes inhibidores utilizados son colorantes, sales biliares, alcoholes, ácidos y antibióticos.

Medios diferenciales. Contienen uno o varios factores, que permiten que las colonias de una especie exhiban ciertas características metabólicas o de cultivo que puedan utilizarse para diferenciarlas de otras bacterias que crecen en el mismo medio.

Los medios de cultivo preparados deben almacenarse lejos de la luz, todos los medios líquidos se almacenan en frascos o tubos cerrados de preferencia con tapones de rosca de 2 a 8°C. Las placas vertidas deben almacenarse empaquetadas en películas de plástico adherente.

Control de calidad de los medios de cultivo preparados

El Control de Calidad consiste en la evaluación continua y sistemática del trabajo para asegurar que el producto final se encuentra conforme a los límites de precisión y exactitud previamente establecidos.

Todos los medios y reactivos se deben revisar de acuerdo a las especificaciones para establecer su correcto funcionamiento.

Por lo que se debe realizar:

- ▶ **Control macroscópico:** consta de un examen visual en su consistencia (líquida o sólida), color y aspecto (trasparente, opalescente, con o sin precipitado), revisando que estos corresponda con los que indica el proveedor.
- ▶ **Control de pH:** Se realiza con ayuda de un medidor de pH a una temperatura de 25°C, el valor obtenido ha de corresponder con el indicado por el proveedor, donde se da un intervalo de aceptación de $\pm 0,2$.
- ▶ **Control de esterilidad:** Este control se efectúa para comprobar que el medio de cultivo no está contaminado, después de incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $72\text{h} \pm 4\text{h}$, se observa su aspecto, transparencia, si existe turbidez o cambio de color, presencia de gas.
- ▶ **Control de eficacia:** se realiza para comprobar la eficacia del medio de cultivo, observando ciertas características de crecimiento de determinadas cepas de referencia que producen en el medio que se está evaluando.

Pruebas de promoción de crecimiento

Se seleccionan algunas placas de cada lote para realizar la comprobación y se inoculan con microorganismos de reserva o colecciones de cultivos (p.ej. ATCC). Para cada tipo de medio, se deben emplear al menos tres microorganismos diferentes que tengan características de crecimiento con resultado positivo o negativo. El control de los microorganismos debe seleccionarse a partir de un caldo de cultivo con crecimiento activo, un número establecido de UFC y a partir de un asa patrón sembrar directamente en el medio de ensayo, el cual se estría para obtener colonias aisladas.

Medio	Microorganismo de control	Reacciones esperadas
Agar sangre	<i>Streptococcus</i> del grupo A	Crecimiento adecuado, β-hemólisis
	<i>S. pneumoniae</i>	Crecimiento adecuado, α-hemólisis
Agar chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i>	Crecimiento adecuado
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Crecimiento adecuado
Agar eosina azul de metileno	<i>E. coli</i>	Crecimiento adecuado, brillo verde metálico.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Incolora
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Rosa
Agar MacConkey	<i>E. coli</i>	Colonias rosadas (lactosa positivo)
Agar Soya Trypticaseína	<i>E. coli</i>	Crecimiento adecuado
Agar cetrimida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crecimiento adecuado
	<i>S. aureus</i>	Inhibido
Agar Brolacin	<i>E. coli</i>	Colonias grandes de color amarillo, medio circundante color amarillo.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonias con centro de color marrón, medio circundante azul.
Agar citrato de Simmons	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crecimiento, color azul.
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
Malonato	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Crecimiento adecuado, azul.
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	

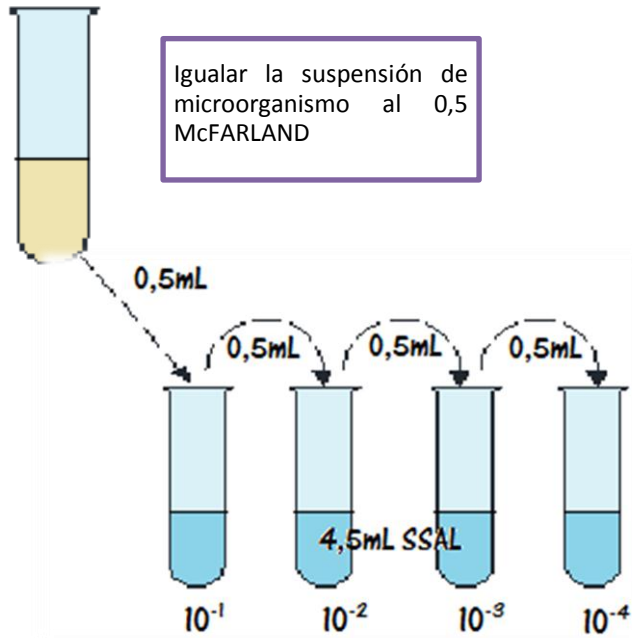
Para medios de cultivo sólidos, el crecimiento no debe diferir del valor de un inoculo estandarizado en un medio de cultivo analizado y aprobado previamente (lote control).

Los medios de cultivo líquidos, cumplen la prueba de promoción si el crecimiento del microorganismo de prueba es comparable con el crecimiento de un lote de medio analizado y aprobado previamente (lote control).

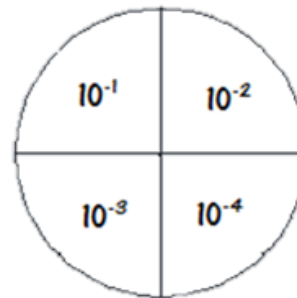
Al iniciar un programa de control de calidad, deben establecerse algunas prioridades como, empezar el ensayo por el medio que probablemente presente más deficiencias, por lo tanto la máxima prioridad se debe dar a los medios de Agar Sangre, Agar Chocolate y agar Tayer-Martin.

Microorganismo	Promoción de crecimiento	
	Recuento de mesófilos aerobios	Recuento de hongos filamentosos y levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Soya Trypticaseína ≤100UFC 30-35°C ≤3 días	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Soya Trypticaseína ≤100UFC 30-35°C ≤3días	
<i>Candida albicans</i>	Agar Soya Trypticaseína ≤100UFC 30-35°C ≤5 días	Agar Sabouraud Dextrosa ≤100UFC, 20-25°C, ≤5 días

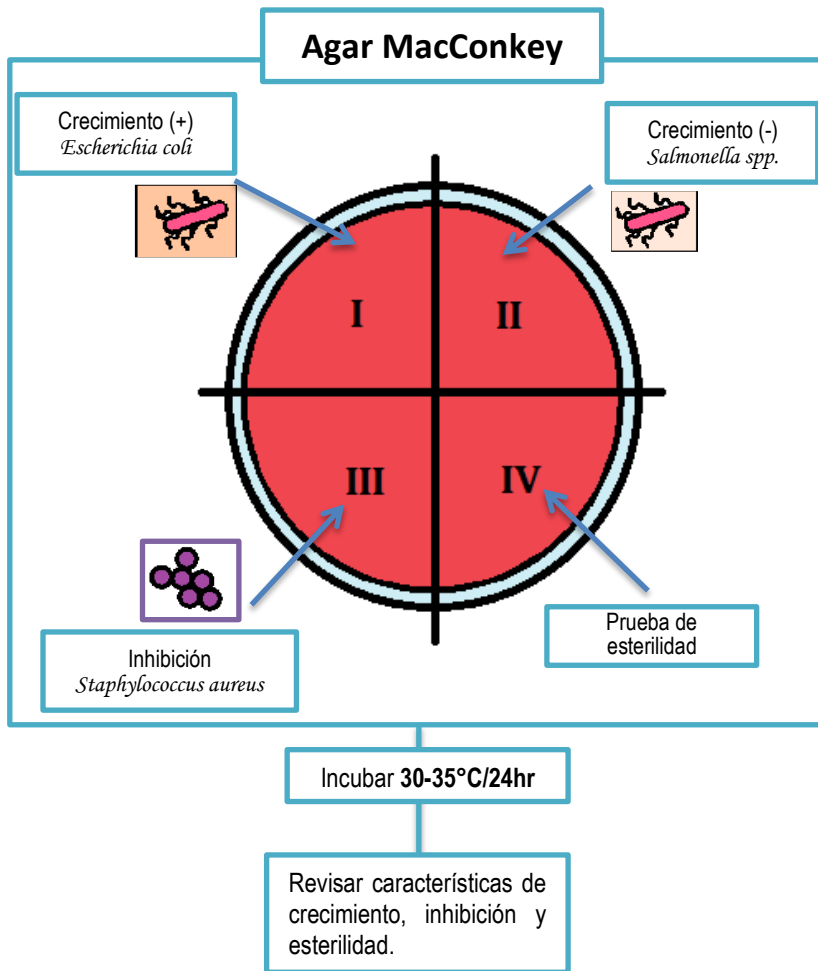
DIAGRAMA DE TRABAJO



Realizar una serie de diluciones con Solución Salina.



*Sembrar las diluciones en Agar Soya Trypticaseína, con ayuda de un asa calibrada (2mm)
*Incubar 30-35°C/24hrs
*Realizar el conteo de las colonias.



Para las pruebas Bioquímicas se utiliza un Control positivo, un Control negativo (sin sembrar) y realizar Prueba de Esterilidad.

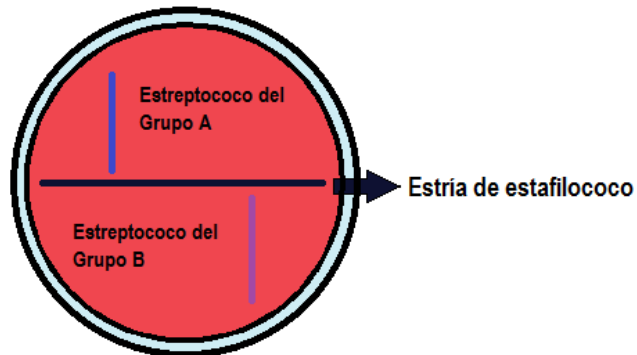
Medio	Microorganismo Control Y Reacciones esperadas
Agar Urea de Christensen	<i>Proteus mirabilis</i> Completamente rosa
Lisina descarboxilasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Amarillo
Ornitina	<i>Proteus mirabilis</i> Azulado
Indol (Kovac)	<i>E. Coli</i> Rojo
Agar hierro de Kligler	<i>E. Coli</i> Ácido/ ácido
Voges-Proskauer	<i>K. Pneumoniae</i> Adicionando (α-naftol y KOH 40%) "rojo"
Caldo nitrato	<i>E. Coli</i> Adicionando: 1. α-naftilamina + ac. Sulfanílico 2. Zinc "rojo"

CAMP

Hacer en el centro de una placa de Agar Sangre una estria en línea recta con *Staphylococcus aureus* (β -hemolisina).

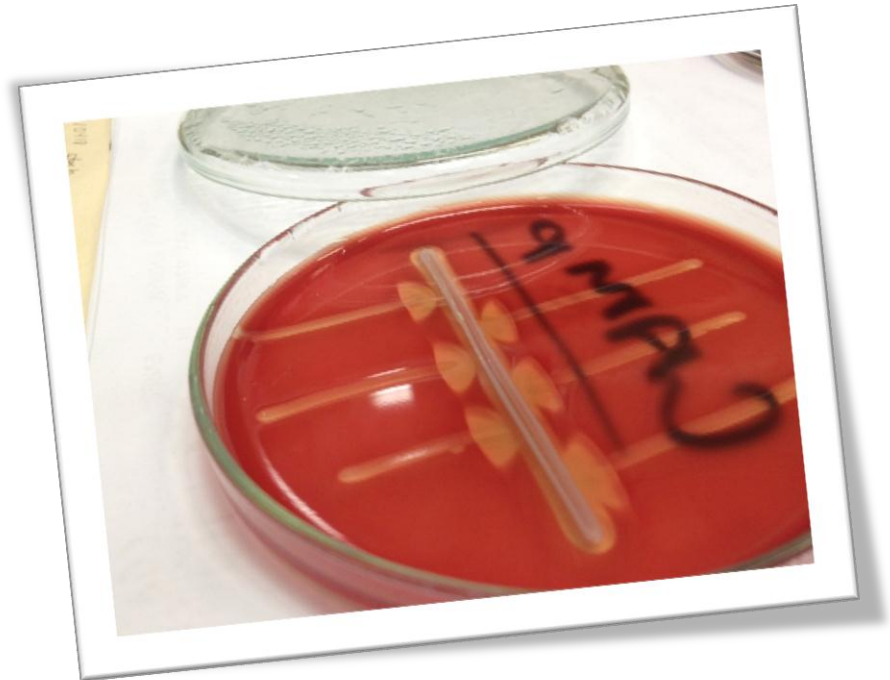
Hacer una estria con Streptococcus del grupo B β -hemolíticos (*Streptococcus agalactiae*) en forma perpendicular a la estria del estafilococo. Control positivo.

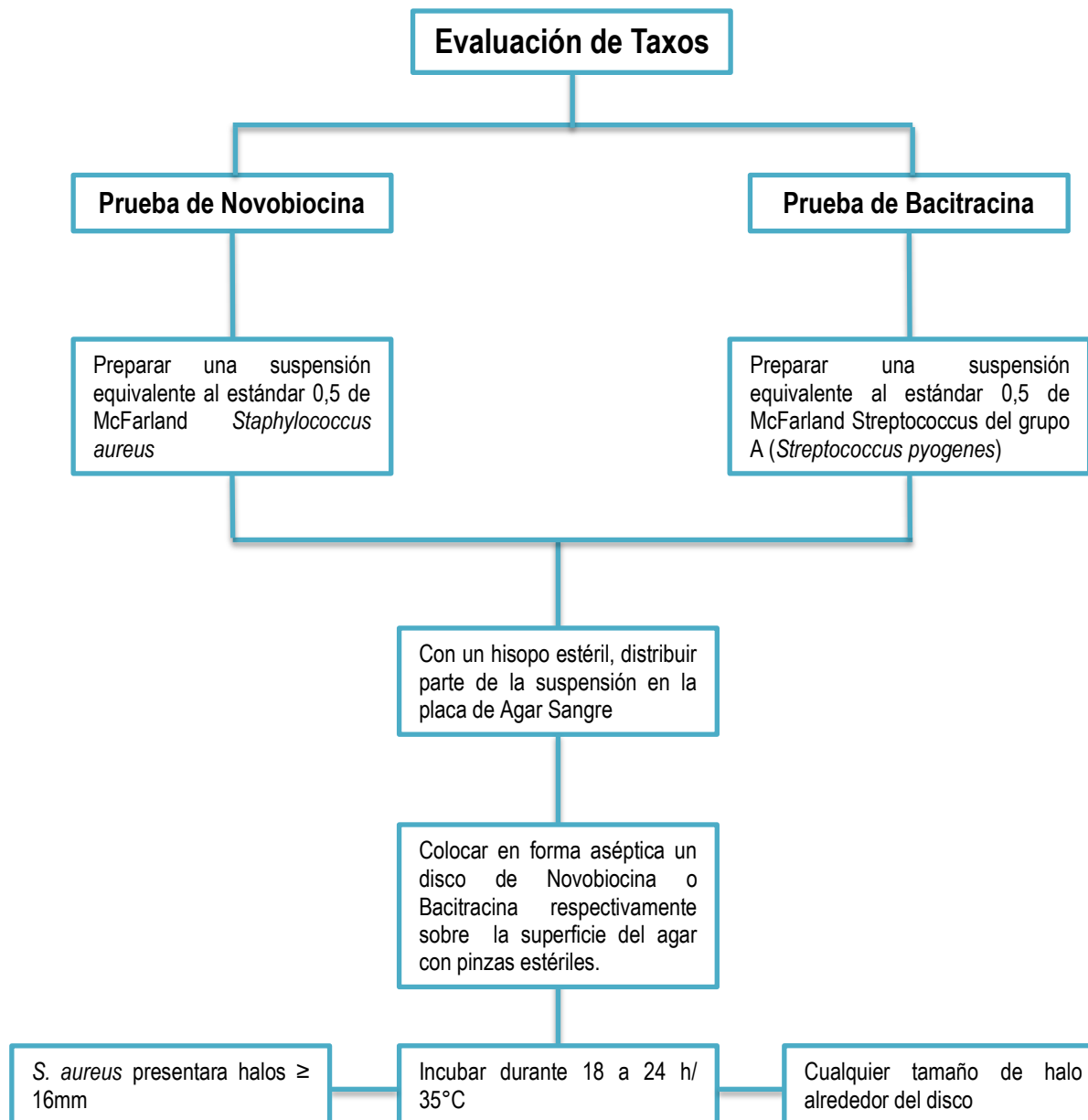
Sembrar en forma similar un Streptococcus del grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Como control negativo.



Incubar a 35°C/18-24 h

Una prueba positiva se observa en la zona de aumento de la hemólisis en donde se intersecan la β -hemolisina secretada por el estafilococo y el factor CAMP secretado por el estreptococo del grupo B.





A high-speed photograph of water being poured from a glass pitcher into a clear glass. The water is captured in mid-pour, creating a dynamic splash and bubbles. The background is a plain, light color. A white rounded rectangular box is overlaid on the right side of the image, containing the title text.

Análisis Microbiológico de Agua

■ Objetivo:

Conocer los métodos utilizados para el análisis microbiológico de agua, así como los medios empleados para la identificación bacteriana, basado en las normas mexicanas establecidas.

Introducción

El agua para uso y consumo humano se define como, aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.

La vigilancia de la calidad del agua es fundamental para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades a la población por consumo, como las de tipo gastrointestinal y las producidas por contaminantes tóxicos; esto se ejerce a través del cumplimiento de los límites permisibles de calidad del agua e inspeccionando que las características de las construcciones, instalaciones, plantas cloradoras, de potabilización, tanques de almacenamiento o regulación, líneas de conducción, redes de distribución, cisternas de vehículos para el transporte y distribución domiciliaria protejan el agua de contaminación. Este resultado se evalúa comparando las condiciones que presentan los sistemas de abastecimiento, con los requisitos sanitarios que permiten preservar la calidad del agua.

El control y la detección de microorganismos indicadores y patógenos constituyen una parte importante de la microbiología sanitaria. Con la cloración del suministro de agua potable se puede controlar la mayor parte de las bacterias patógenas.

Las bacterias del tracto gastrointestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, ya que están sometidas a un estrés fisiológico y pierden gradualmente la capacidad para formar colonias en los medios, de ahí algunos métodos específicos establecidos.

Como resultado de la contaminación con residuos fecales se pueden producir una amplia variedad de enfermedades virales, bacteriana y protozoarias. Se han empleado microorganismos indicadores como un índice de contaminación posible del agua por agentes patógenos humanos.


Los coliformes, incluyendo *E. coli*, son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, estas bacterias constituyen aproximadamente el 10 % de los microorganismos intestinales de los seres humanos y se utilizan ampliamente como organismos indicadores. Cuando esta bacteria indicadora no se detecta en un volumen específico de agua, esta se considera potable o adecuada para el consumo humano.

El grupo de coliformes incluye *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Los **coliformes** se definen como bacterias anaerobias facultativas, gramnegativas, no esporulantes, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 horas a 35-37°C.

Los **coliformes fecales o termotolerantes** presentan las mismas características y propiedades fermentativas a 44°C, como *E. coli*.

Los **enterococos fecales**, han sido utilizados cada vez más como indicadores de contaminación fecal en aguas salobres y marinas. En aguas saladas estas bacterias mueren a una velocidad más lenta que los coliformes fecales, siendo indicadores más seguros de una posible contaminación reciente.

El contenido de organismos resultante del examen de una muestra simple de agua, debe ajustarse a lo establecido:

CARACTERÍSTICA	LIMITE PERMISIBLE
 Coliformes Totales	Ausencia o no detectables
<i>E. coli</i> o coliformes fecales (organismos termotolerantes)	Ausencia o no detectables

NOM-127-SSA1-1994

El objetivo de un programa de monitoreo microbiológico para un sistema de agua, es el de proporcionar información suficiente para controlar la cantidad microbiológica del agua producida.

Para el análisis se necesitan frascos de vidrio con tapón esmerilado, frascos estériles desechables o bolsas estériles con cierre hermético y capacidad de 125 o 250mL. En su interior colocar previo a la esterilización (frascos de vidrio), 0.1mL de solución de tiosulfato de sodio al 1% con el propósito de inhibir la acción del cloro que puede contener la muestra.

El uso de cultivos tradicionales para el monitoreo microbiológico de agua incluye, el método de vaciado en placa, filtración por membrana y prueba del número más probable (NMP).

Recuento de microorganismos mesófilos aerobios

Método en placa. Inocular 1,0 mL de la muestra en cajas de Petri estériles, añadir a cada caja de 15 mL a 20 mL del medio Agar Triptona Extracto de Levadura o Agar Soya Tripticaseína a una temperatura aproximada de 45°C a 48°C. Con movimientos rotatorios mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo. Permitir que el medio de cultivo solidifique e incubar las placas en posición invertida de 30-35°C/48-72 h.

Determinación del Número más Probable (NMX-AA-42-1987)

Pruebas presuntivas

La muestra debe ser mezclada perfectamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos. Hacer las diluciones necesarias, utilizando series que consten de por lo menos tres diluciones (p.ej. 10.0 mL, 1.0 mL y 0.1 mL), por cada dilución debe haber de 3 a 5 tubos. Las diluciones se realizan en tubos de tapón de rosca con diluyente preesterilizado (caldo lactosado, rojo de fenol), transfiriendo un volumen de la muestra por nueve volúmenes de diluyente, con proporciones de prueba de un volumen mínimo de 5mL por tubo.

Incubar los tubos inoculados de 35 a 37°C durante 48 horas.

El examen de los tubos se realiza después de un periodo de incubación de 18 a 24 horas. Un resultado positivo se considera en aquellos que muestren turbidez y formación de gas en los tubos invertidos (Durham), y la producción de ácido. Reincubar los tubos que no muestren cambios y examinarlos nuevamente a las 48 horas.

Pruebas de confirmación

Se realizan resiembras a partir de cada tubo que mostró un resultado positivo. Para confirmar la presencia de organismos coliformes, inocular en caldo lactosa verde brillante o caldo EC a 35°C durante 24-48 horas y examinarlo. Para coliformes termotolerantes, inocular en caldo bilis lactosa verde brillante o caldo EC a 44°C durante 24-48 horas. En el caso de la confirmación de *E. coli* presuntiva, inocular un tubo de agua triptona en las mismas condiciones, después de este periodo de incubación, añadir de 0.02 a 0.3 mL de reactivo de Kovacs, la formación de un anillo de color rojo denota la presencia de indol y verifica positivo para coliformes fecales.

Pruebas finales.

Se siembra por estrías sobre placas de agar EMB o medio m Endo LES a partir de los tubo positivos y se incuban a 35°C durante 24 horas, examinar y tomar las colonias para inocular en un agar nutritivo y un tubo de caldo, después de 24 horas de incubación. Realizar la prueba IMViC reportar resultados p.ej. *E. coli* (++--), si se muestran fermentadores de lactosa, con producción de gas, la prueba final es positiva.

Filtración por membrana

Los filtros de membrana (0.45µ) se han utilizado ampliamente con agua que no contiene niveles elevados de organismos de fondo, sedimento o metales pesados.

En este método se pasa la muestra de agua a través de un filtro de membrana. El filtro con las bacterias atrapadas se transfiere a la superficie de un medio sólido o a un soporte absorbente, conteniendo el medio líquido deseado. El uso del medio apropiado permite la rápida detección de coliformes totales, coliformes o estreptococos fecales, por la presencia de sus colonias características.

Readycult

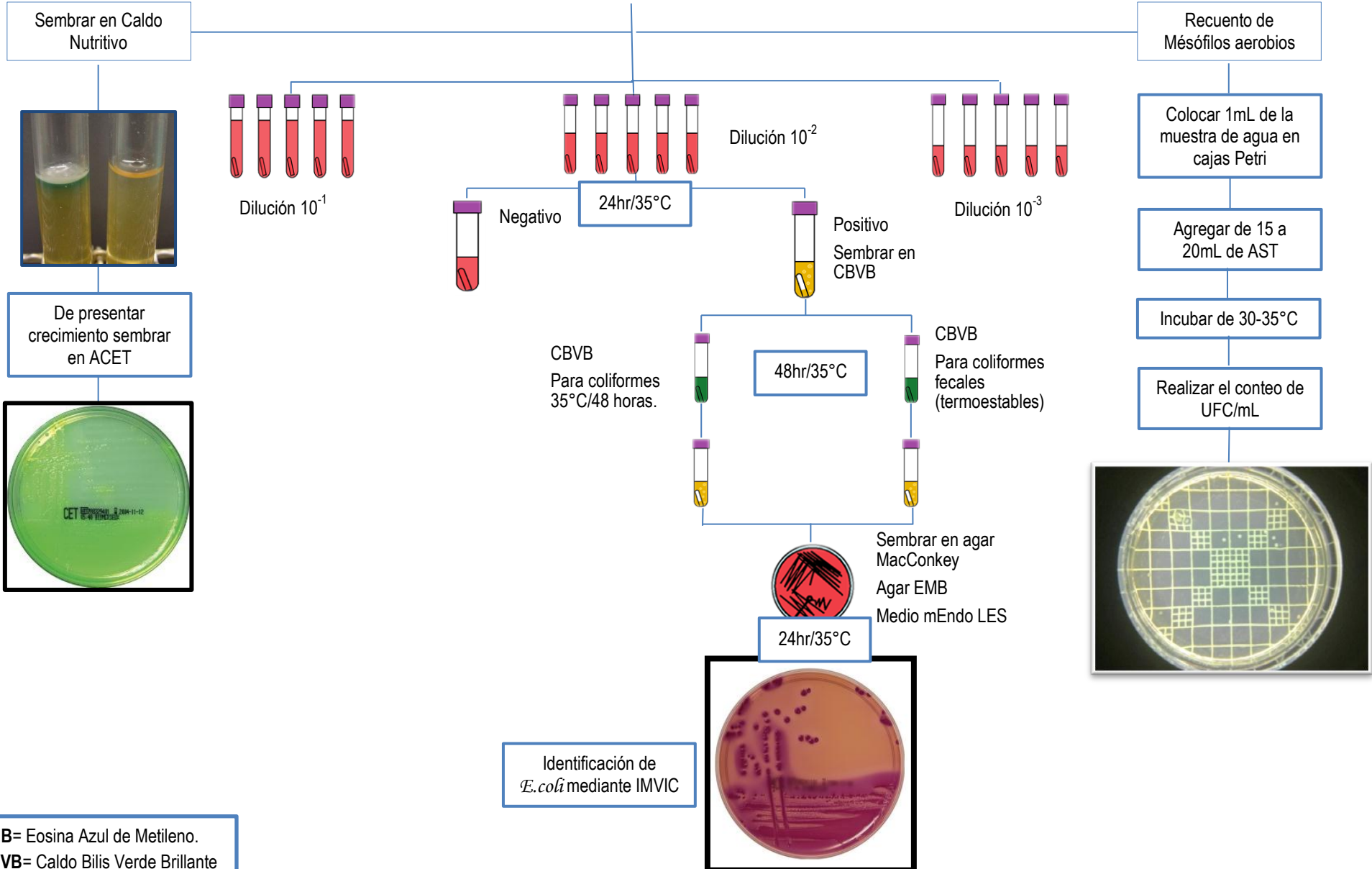
El medio Readycult es un caldo enriquecido selectivo para la detección simultanea de Coliformes totales y *E. coli*, utilizado en el análisis de agua.

La alta calidad nutricional de las peptonas y el buffer de fosfatos incorporado garantiza un rápido crecimiento de coliformes, mientras que el laurilsulfato inhibe otros microorganismos presentes en la muestra en especial grampositivos.

Al añadir el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) el cual es hidrolizado por coliformes y el 4-metilumbeliferil- β -glucuronido (MUG) específico para *E. coli* hace que su detección simultanea sea posible. La presencia de coliformes totales es indicado por un color azul-verde presente en el caldo y *E. coli* por un color azul, fluorescente bajo luz UV.

	Cambio de coloración azul-verde	Fluorescencia	Reacción de Indol
Coliformes Totales	+		
<i>E. coli</i>	+	+	+
Negativo	amarillo		

DIAGRAMA DE TRABAJO



EMB= Eosina Azul de Metileno.
CBVB= Caldo Bilis Verde Brillante
AST= Agar Soya Trypticaseína

READYCULT



Agregar 50-100 mL de la muestra de agua en un recipiente estéril.

Añadir el contenido (X-gal y MUG) a la muestra de agua.
Cerrar el recipiente



Agitar hasta disolver completamente los gránulos.



Incubar de 35-37°C/18-24h

Con lámpara UV



Positivo

Negativo

Observar resultados



COPROCULTIVO



■ Objetivo:

Conocer los principales agentes etiológicos asociados a las infecciones del sistema gastrointestinal, seleccionando los medios de cultivo adecuados para realizar un coprocultivo para lograr aislar, diferenciar e identificar el agente causal de estas patologías.

Introducción

Las infecciones del sistema gastrointestinal constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. A menudo el origen de estos microorganismos son suministros de agua contaminada con deyecciones humanas, alimento contaminado, zoonosis, pero también pueden adquirirse en los hospitales como la diarrea causada por *Clostridium difficile*, que constituye un problema especial en ancianos hospitalizados. La flora bacteriana normal del tracto digestivo también es causante de diversas infecciones que a menudo se originan a consecuencia de alguna alteración anatómica en las estructuras en que se asientan o en pacientes inmunocomprometidos.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones digestivas son fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea, la presencia y naturaleza de la última, constituyen las bases para la clasificación de tales infecciones en tres síndromes principales:

■ Diarrea acuosa.

La forma más común es la aparición rápida de evacuaciones intestinales frecuentes de carácter más o menos líquido, puede haber náusea, vómito, fiebre y dolor abdominal. La diarrea acuosa puede ser producida por bacterias que secretan enterotoxinas como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigenica (ECET).

■ Disentería.

Se inicia con la rápida aparición de evacuaciones intestinales frecuentes, pero las heces pueden presentarse con sangre o moco. La fiebre, dolor abdominal y tenesmo son manifestaciones frecuentes. El sitio de alteración patológica es el colon. Los agentes causantes de disentería pueden inducir cambios inflamatorios, destructivos o de ambos tipos por invasión directa o producción de citotoxinas. Ejemplo: *Shigella dysenteriae*.

■ Fiebre entérica.

Se trata de una infección sistémica cuyo sitio de origen son el tubo digestivo. Sus características son fiebre y dolor abdominal las cuales aparecen de forma gradual durante algunos días. La diarrea suele estar presente pero puede ser leve. Su patogenia implica la penetración a las células de la porción distal del intestino delgado por el microorganismo, con la consecuente diseminación fuera del intestino. Ejemplo: *Salmonella typhi*.

Coprocultivo

Los procedimientos diagnósticos por el laboratorio incluyen estudio físico, microscópico, cultivo, detección de toxinas y procedimientos serológicos.

La técnica diagnóstica microbiológica que conduce al aislamiento y/o identificación del agente etiológico, se le conoce con el nombre de coprocultivo, por el cual además, vista la variada flora intestinal, es posible discernir entre los verdaderos patógenos y los que son microorganismos saprófitos de esa zona.

Las muestras para coprocultivo se deben tomar antes de la administración de antibióticos, agentes laxantes o antiácidos, en un recipiente limpio.



Si las heces son formadas o pastosas se toma una porción del recipiente donde hayan sido emitidas y se transfieren al sistema elegido para el envío al laboratorio, seleccionando zonas donde haya sangre, moco o pus.




El tamaño mínimo de muestra debe ser al menos de 2 g, aunque se recomiendan 4 g para realizar la mayoría de las investigaciones posibles, si las heces son líquidas se recogerán entre 5 y 10 mL. En el caso de neonatos o adultos gravemente debilitados se aconseja el uso de hisopados rectales, en este caso el hisopo debe internarse más allá del esfínter anal, inoculando inmediatamente en medios de cultivo.

Las muestras fecales deben examinarse y cultivarse lo antes posible después de la recolección. En primer lugar se realiza un examen directo, en busca de leucocitos, eritrocitos, levaduras o ciertos huevos o parásitos; todo ello proporciona indicios en cuanto a causa y efectos secundarios de diarreas infecciosas.

Este examen directo puede realizarse en fresco, depositando una gota de heces en un portaobjetos, cubriendo con un cubreobjetos o mediante un frotis teñido generalmente mediante tinción de Gram, los leucocitos pueden observarse teñidos con azul de metileno. Si las heces no son muy diarreicas deben diluirse en caldo o solución salina antes de preparar un frotis.

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento del patógeno mediante cultivo. Debido a la flora normal existente en este tipo de muestras, es necesario utilizar medios de enriquecimiento, medios selectivos y diferenciales.

<p>Fisiología: Son bacilos gramnegativos de tamaño intermedio, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos y no forman esporas. Crecen rápidamente de forma aerobia o anaerobia. Fermentan glucosa, reducen nitratos, son catalasa positivos y oxidasa negativos.</p>	Cuadro clínico.	Agar MacConkey	Salmonella-Shigella	XLD	Agar Sulfito Bismuto
<p><u>Escherichia coli</u></p>  <p>En algunas cepas es posible apreciar la presencia de cápsula.</p>	<p><i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET): Diarrea del viajero. Diarrea acuosa, vómitos, espasmos abdominales, náuseas, febrícula.</p> <p><i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP): Causa diarrea infantil acuosa no sanguinolenta y vómitos.</p> <p><i>E. coli</i> enteroinvasiva (ECEI): fiebre, espasmos, diarrea acuosa; puede progresar a disentería con escasas heces sanguinolentas.</p> <p><i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH): Inicialmente diarrea acuosa, seguido de diarrea sanguinolenta con espasmos abdominales; sin fiebre o con febrícula.</p> <p><i>E. coli</i> enteroadherente (ECEA): Diarrea infantil. Diarrea acuosa persistente, deshidratación y febrícula.</p>	Colonias grandes rojas rodeadas por una zona de bilis precipitada.	Rosa-rojo, medio de color rojo.	Colonias amarillas brillantes.	Crecimiento inhibido o colonias verdes.
<p><u>Salmonella spp.</u></p>  <p>Las colonias no fermentan lactosa, la mayoría de las cepas son móviles, producen ácido y gas a partir de glucosa, manitol, dulcitol y sorbitol, son indol (+), la mayoría son citrato y H₂S (+), a excepción de algunas especies como <i>S. typhi</i>.</p>	Existen 4 formas de infección por <i>Salmonella</i> : gastroenteritis, septicemia, fiebre entérica y colonización asintomática.	Incoloras, traslúcidas.	La mayoría de salmonellas, muestran colonias traslúcidas o incoloras, otras especies son incoloras con el centro negro, en medio amarillento.	Rojas traslúcidas con centro negro.	<i>S. typhi</i> colonias con centro negro, borde claro y brillo metálico. <i>S. typhimorium</i> , colonias negras a verdes.

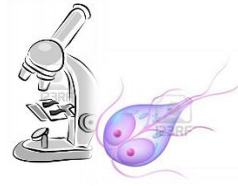
<p><u>Shigella spp.</u></p>  <p>Son inmóviles (no poseen antígenos H) y generalmente no produce gas al fermentar los carbohidratos y no fermentan lactosa, no producen capsula. En KIA producen bisel alcalino y fondo ácido (K/A), pero no producen gas ni H₂S; motilidad, urea y LIA son negativas.</p>	<p>Son los agentes etiológicos de la llamada disentería bacilar. Causan diarrea sanguinolenta con presencia de moco o pus.</p>	<p>Incoloras, traslúcidas en medio amarillento.</p>	<p>Incoloras, transparentes, en medio amarillento. Frecuente inhibe el crecimiento de <i>S. dysenteriae</i>.</p>	<p>Colonias traslúcidas.</p>	
<p><u>Yersinia enterocolitica</u></p>  <p>Esta especie puede crecer a bajas temperaturas, o sea, pueden crecer hasta alcanzar un número elevado en los productos alimentarios o sanguíneos contaminados y refrigerados. Fermenta glucosa sin producción de gas, es indol (-), lisina (-), citrato (-), RM (+).</p>	<p>Se caracteriza por producir diarreas que pueden ser líquidas o mucoides con la presencia de leucocitos en heces, se acompaña de fiebre alta, también puede presentarse dolor abdominal.</p>	<p>Colonias muy pequeñas, puntiformes, traslúcidas y lisas.</p>			
<p><u>Campylobacter jejuni</u></p>  <p>En Gram muestran formas espiraladas curvas, con forma de "S", en alas de gaviota o alargadas. Hidrólisis de hipurato positivo.</p>	<p>Produce enteritis o enterocolitis, es más frecuente en niños y adultos jóvenes. Los síntomas característicos son diarrea, malestar, fiebre y dolor abdominal. La diarrea puede ser acuosa y abundante o puede acompañarse de sangre y moco cuando el compromiso es del colon. En algunos casos la colitis es tan intensa que puede confundirse con colitis ulcerativa.</p>	<p>En este caso es necesario utilizar medios selectivos, con antibióticos que inhiban el crecimiento de otras bacterias y con suplementos como sangre o carbón: medio de Blazer (Campy-BAR), medio de Preston, Campy-Thio, la incubación en un ambiente microaerofílico es indispensable. La morfología en agar varía desde colonias grises, plana y de forma irregular que pueden ser secas o húmedas hasta colonias redondeadas, convexas y brillantes con bordes definidos. Las colonias tienden a formar un crecimiento confluyente a lo largo de las líneas de siembra sobre la superficie del agar. No se observan reacciones hemolíticas en agar sangre.</p>			

Enterobacterias, cuadro clínico y características morfológicas coloniales.

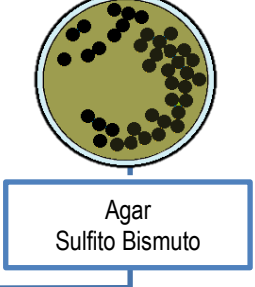
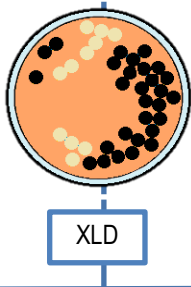
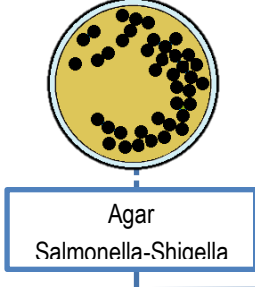
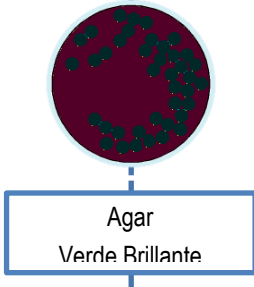
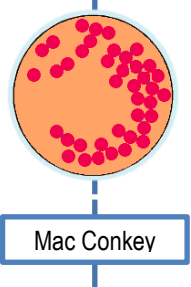
DIAGRAMA DE TRABAJO

Muestra de heces

Examen directo: Tinción de gram y con Azul de metileno; en busca de leucocitos, eritrocitos, levaduras o ciertos parásitos como *G. lamblia*.



Caldo Selenito/ tetrionato (*Salmonella*)
Algunas horas después de la inoculación, el caldo se vuelve turbio. Como los coliformes u otra flora intestinal puede crecer más que los patógenos, se recomienda subcultivar.



Seleccionar colonias sospechosas
Realizar pruebas de IMViC
Pruebas bioquímicas secundarias.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Yersinia</i>
Rojo de Metilo	+	+	+	+
Voges-Prokauer	-	-	-	-
Indol	(+)	d	-	d
Citrato	-	-	(+)	(-)
H ₂ S	-	-	(+)	-
Ureasa	-	-	-	d
Gas a partir de glucosa	+	-	(+)	(-)
Ácido a partir de lactosa	+	-	(-)	(-)
Fenilalanina	-	-	-	-
Lisina	(+)	-	(+)	(-)
Ornitina	(+)	d	(+)	d
Motilidad	d	-	(+)	-
Licuefacción de gelatina	-	-	-	(-)

(+) Reacción positiva en la mayor parte de las cepas
 (-) Reacción negativa en la mayor parte de las cepas
 d, Las especies varían en cuanto a la presencia de estas características

A detailed 3D rendering of numerous Vibrio cholerae bacteria. The bacteria are depicted as pinkish-red, comma-shaped organisms with a distinct curved body and a long, thin flagellum extending from one end. They are scattered across a dark, grid-patterned background, creating a sense of depth and movement. A semi-transparent black box with a white border is positioned in the center-right of the image, containing the text 'Vibrio cholerae' in a white, italicized serif font.

Vibrio cholerae

■ Objetivo:

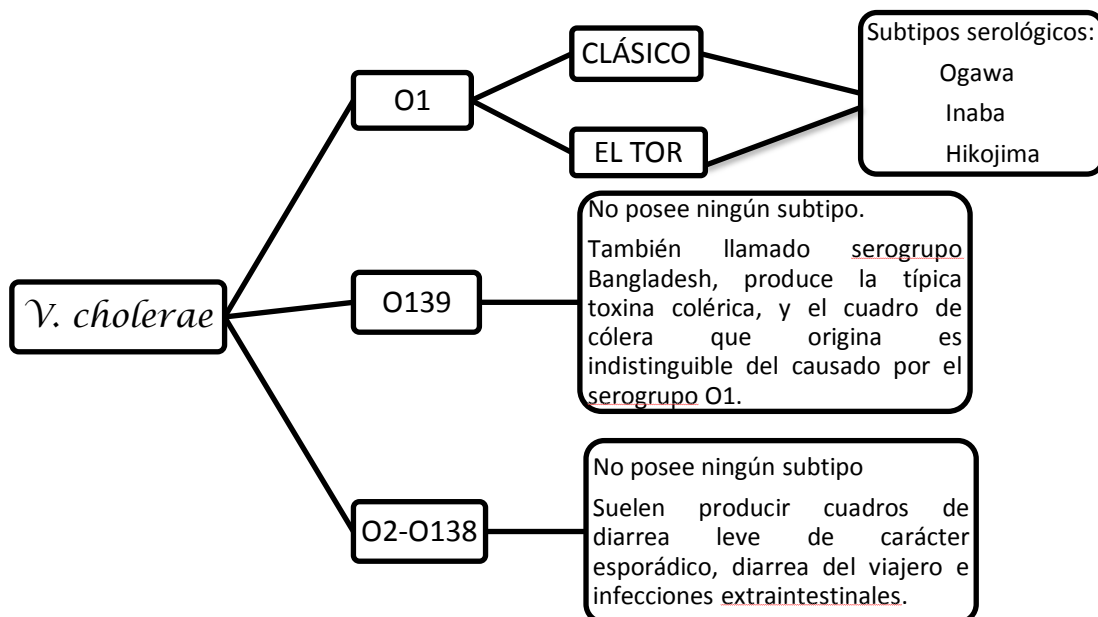
Conocer las características que presenta *Vibrio cholerae* con los métodos adecuados para su aislamiento, crecimiento e identificación.

Introducción

El género *Vibrio* se encuentra en la familia *Vibrionaceae*. Son bacilos cortos, curvados, en forma de coma, gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, que no forman cápsula, ni esporas, ni fimbrias. Son móviles con uno o más flagelos polares (monotricos o multitricos). Las especies que se dispersan en el agar tienen flagelos no envainados peritricos. Fermentan la glucosa produciendo ácido pero rara vez gas, reducen los nitratos a nitritos y crecen en el medio TCBS. Crece en una variedad de medios sencillos como Agar Soya Trypticaseína con un intervalo de temperatura de 28-44°C, se desarrolla rápidamente (6-8 hrs) y crece bien en medios alcalinos. Toleran un amplio intervalo de pH (6.5-9), aunque son sensibles a los ácidos gástricos, por lo que pacientes que presentan reducción o neutralización de la secreción de ácidos gástricos son más vulnerables a infecciones por este género.

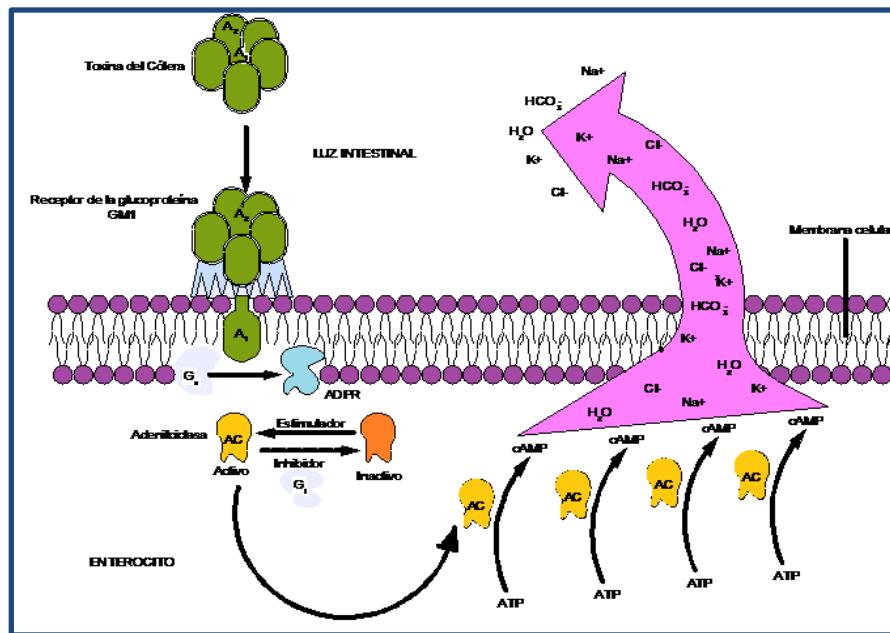
Las especies pueden ser divididas de acuerdo a las diferencias en la composición de su pared celular (antígeno O somático) que clasifica a los microorganismos en 139 serogrupos diferentes. Todos comparten el antígeno flagelar (H) común. Las cepas de *V. cholerae* tipo O1, pueden separarse en uno de tres serogrupos: Inaba, Ogawa e Hikojima.

Las cepas epidémicas de la serovariedad O1 pueden dividirse a su vez en las biovariedades Clásico y El Tor.



El *Vibrio cholerae* es el agente causal del cólera. La ingestión de agua contaminada por heces humanas es el principal mecanismo de transmisión, pero el consumo de alimentos contaminados en el domicilio, restaurantes o por vendedores ambulantes contribuye su diseminación. En áreas endémicas, es sobre todo una enfermedad pediátrica, pero afecta tanto a niños como adultos cuando se introduce en una población, esta enfermedad es más frecuente en los meses de verano y otoño.

Las cepas toxigénicas generan una toxina que se une a un receptor sobre la membrana de la célula epitelial, activa la adenilatociclasa y produce niveles elevados de adenosinmonofosfato cíclico e hipersecreción de sal y agua, lo que conduce a la diarrea característica en “agua de arroz”. Como se muestra en la siguiente figura.



Los primeros síntomas de la enfermedad se presentan 2 a 5 días después de la infección y están dados por la acción de la toxina colérica que se fija al nivel de la membrana de la célula intestinal ocasionando vómito, evacuaciones líquidas muy abundantes con restos de mucosa intestinal “agua de arroz” y borborismos con dolor abdominal.

Diagnóstico

En general, las especies de *Vibrio* son muy sensibles al desecamiento, la exposición a la luz solar y el desarrollo de un pH ácido. En el caso de no poder cultivar inmediatamente, estos microorganismos se mantienen viables en un medio de transporte semisólido de Cary-Blair. Las muestras sospechosas deben ser inoculadas en agar sangre de carnero al 5% y agar de MacConkey e inocular también en una placa de agar TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa).

El agua peptona alcalina es el más útil de los medios líquidos de enriquecimiento. Se incuban a 36°C y luego se subcultivan a las 8 horas y de nuevo entre las 16 y 24 horas. También crece en MacConkey como colonias lactosa negativas. El agar TCBS es un medio selectivo, muy útil para el cultivo de *V. cholerae* (colonias sacarosa fermentadoras) y *V. parahemolyticus* (no fermentadoras). Si no se utiliza agar TCBS se deben evaluar las colonias hemolíticas que aparecen en agar sangre de carnero después de una incubación durante toda la noche para detectar actividad de citocromo oxidasa.

Los caldos de enriquecimiento con agua peptonada alcalina (APW, contiene peptona al 1% y NaCl al 1% a un pH de 8.6) deben cultivarse en agar TCBS para una mejor evaluación de las colonias que crecen después de otras 24 a 48 horas de incubación. Se recomienda colocar aproximadamente 1mL de líquido o 1g de heces en 10mL de APW en un tubo con tapa de rosca. Los vibriones crecen en la mayoría de los medios de aislamiento, el crecimiento aumenta agregando NaCl al 1% al medio. Las colonias son lisas, convexas, de consistencia cremosa, blanco grisáceas y tienen bordes continuos.

En agar TCBS después de 18 a 24 horas *V. cholerae* crece como colonias amarillas lisas, de 2 a 4 mm de diámetro con un centro opaco y una periferia transparente, debido a que *V. parahemolyticus* no utiliza la sacarosa, las colonias se muestran verde azuladas.

V. cholerae puede ser distinguido de otras especies por medio de la prueba de “La Cuerda” o “hilo perlado”, la cual se realiza mezclando colonias bacterianas con algunas gotas de desoxicolato de sodio al 0,5% en un portaobjetos, se introduce un asa en la mezcla y se la separa de la gota produciendo una cuerda larga después de 60 segundos.

PRUEBA	
Agar hierro de Kligler	Alc/ac
Catalasa	+
Esculina	-
Motilidad	+
Indol	+
Voges-Proskauer	(-)
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+
Carbohidratos:	
Lactosa	-
Sacarosa	+
Manitol	+
Inositol	-

Características Bioquímicas

En las deposiciones en forma de “agua de arroz” de los pacientes con cólera, el *V. cholerae* O1 por lo general está en muy altas concentraciones (10^6 a 10^8 UFC. /mL). Por lo anterior existe suficiente antígeno para detectarlo por aglutinación con partículas de látex.

DIAGRAMA DE TRABAJO

Muestra de heces
"agua de arroz"



Agua Peptonada



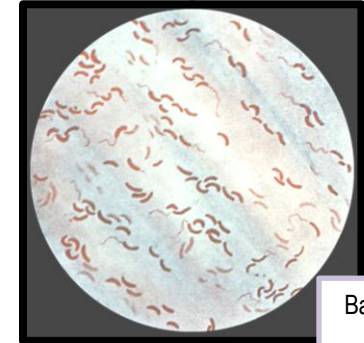
TCBS. Incubación de 6-8hrs,
formación de colonias planas de
color amarillo.



Müller Hinton



Soya Trypticaseína



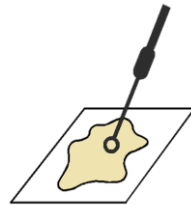
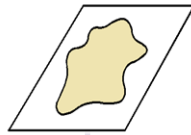
Bacilo curvo Gram
negativo

Prueba de la Cuerda

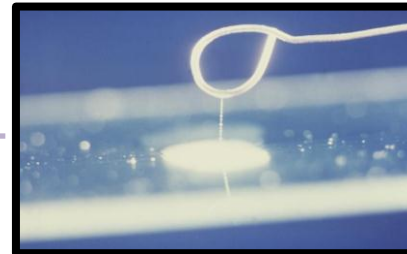
Tomar una asada de una colonia



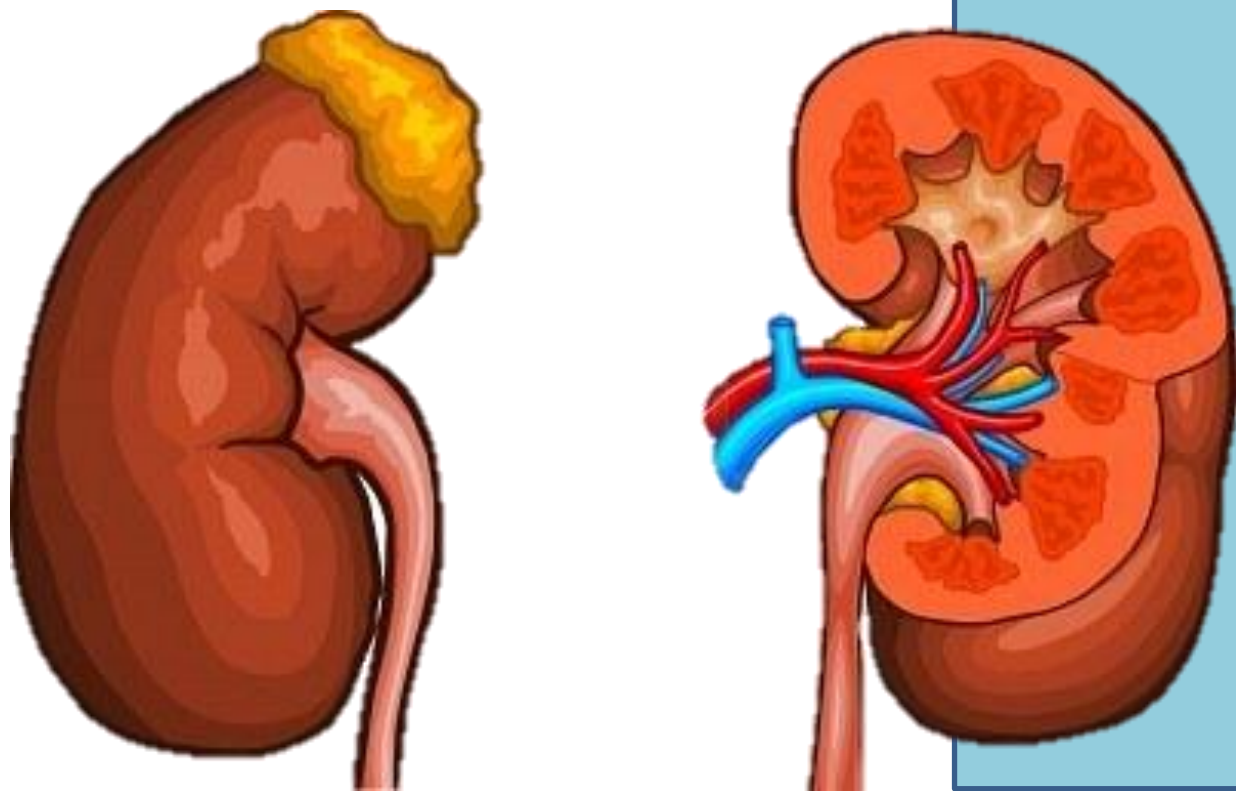
Agregar unas gotas
desoxicolato de sodio 0,1



Introducir el asa en la mezcla, separar
y observar la formación de la cuerda.



UROCULTIVO



■ Objetivo.

Conocer los pasos implicados al realizar un urocultivo el cual nos ayudará a determinar la presencia, número y sensibilidad a los antibióticos de los principales microorganismos asociados a las infecciones en vías urinarias.

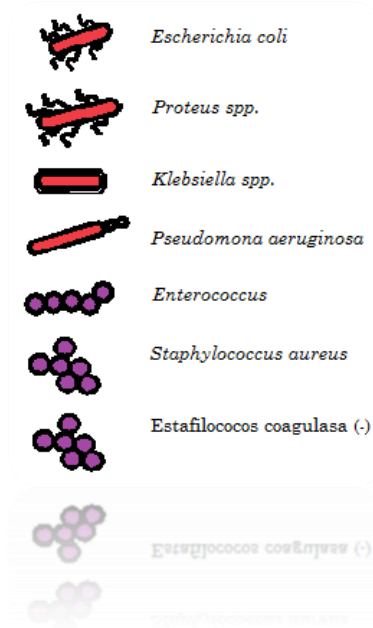
INTRODUCCIÓN

El aparato urinario se divide en una porción superior, compuesta por los riñones, la pelvis renal y los uréteres, y una porción inferior, compuesta por la vejiga y la uretra.

Las principales manifestaciones clínicas de las infecciones urinarias altas son fiebre (a menudo con escalofríos) y dolor en el flanco. En pacientes con pielonefritis los primeros síntomas son compatibles con los de las infecciones urinarias bajas, las cuales suelen comprometer la vejiga o la uretra. Las manifestaciones clínicas usuales son la micción frecuente y sin dolor, de pequeñas cantidades de orina turbia (frecuencia y disuria) y malestar o dolor suprapúbico.

El análisis de orina, nos ayuda a determinar, tanto sus características físicas, químicas y celulares, como identificar la presencia, cantidad y sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos aislados a través del cultivo.

Escherichia coli causa la mayor parte de las infecciones agudas adquiridas en la comunidad. En pacientes hospitalizados y en infecciones recurrentes del tracto urinario, acompañadas de anomalías estructurales, obstrucción y otros factores predisponentes como embarazo, diabetes, etc., los microorganismos causantes suelen ser especies de *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* y *Enterobacter spp*, así como también especies de *Enterococcus spp* y *Staphylococcus spp*.



Mientras que *Corynebacterium urealyticum* es un patógeno nosocomial de importancia en ITU. En cuanto a hongos, *Candida spp* se encuentra en pacientes con cateterización y que han recibido terapia antimicrobiana. El *S. saprophyticus* se puede aislar en muestras de mujeres jóvenes y sexualmente activas.

La frecuencia de IVU (Infección en Vías Urinarias) en neonatos es del 1% a 2% y más frecuente en niños que en niñas durante los primeros 3 meses. La falta de circuncisión, predispone a este tipo de infecciones, tanto en infantes como en niños jóvenes. En la edad preescolar es más común ITU en niñas que en niños.

En adultos la presencia de bacteriuria asintomática es mayor en la población femenina. Dentro de los factores de riesgo para una infección en mujeres están: coito frecuente, uso de diafragma (especialmente con espermicida), no orinar después del coito, e

historia de infecciones recurrentes. Al igual que en menores, en hombres jóvenes la carencia de circuncisión aumenta el riesgo de adquirir una ITU por cepas uropatógenas de *E. coli*.

En cuanto a la población mayor de 65 años, algunas causas pueden ser uropatía obstructiva de la próstata y pérdida de la actividad bactericida de las secreciones prostática en hombres, pobre vaciamiento de la vejiga debido a prolapso en las mujeres, enfermedad neuromuscular y uso de catéter en ambos sexos.

Diagnostico presuntivo

Para realizar el diagnóstico de infección en tracto urinario, el primer paso es el examen microscópico de la orina. La mayor parte de pacientes con bacteriuria presenta piuria (>10 leucocitos/mm³ en orina sin centrifugar). La presencia de leucocitos es una fuerte evidencia de pielonefritis, pero su ausencia no excluye una infección de tracto superior. También se observan leucocitos en casos de enfermedad renal, sin infección.

Ocasionalmente se observa hematuria micro o macroscópica, en pacientes con ITU, pero puede estar presente en otras patologías como cálculos, tumores, vasculitis, glomerulonefritis y tuberculosis renal.

La proteinuria es un hallazgo común en este tipo de infecciones, la mayoría de los pacientes excretan menos de 2 gr de proteínas en 24 horas; la excreción de 3 o más gramos sugiere enfermedad glomerular.

Una de las pruebas más útiles para el diagnóstico presuntivo es la tinción de Gram. La presencia de al menos un bacilo Gramnegativo por campo en una muestra de orina no centrifugada, obtenida por micción espontánea, correlaciona con 10⁵UFC o más por mL de orina. La tinción de Gram es un método fácil, rápido, de bajo costo y relativamente confiable para detectar bacteriuria significativa.

Diagnóstico por cultivo

La recolección, almacenamiento y el transporte de la orina son fundamentales para el diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario.

Se requieren medios selectivos y no selectivos. Casi siempre es suficiente una combinación de agar sangre de carnero al 5% y de agar MacConkey para el aislamiento de los microorganismos (p.ej. especies de *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*). Cuando el patógeno más esperado es *Escherichia coli*, se prefiere usar EMB debido a la morfología distintiva que presenta en este medio. Algunos incorporan también un medio selectivo para bacterias grampositivas como agar sangre colistina-ácido nalidíxico o agar fenilentalcohol (PEA).

El objetivo del urocultivo es el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen por mL de orina sembrada y la identificación del microorganismo responsable. Un número

$\geq 100\ 000$ UFC/mL se considera una probabilidad muy elevada de infección urinaria, entre 10 000 y 100 000 UFC/mL el significado es dudoso y se debe repetir la prueba, y $< 10\ 000$ UFC/mL o el hallazgo de más de dos microorganismos puede indicar contaminación de la muestra. Sin embargo, se ha demostrado que existen infecciones con un recuento muy bajo, sobre todo si se acompañan de más de 5 leucocitos por campo en el sedimento urinario.

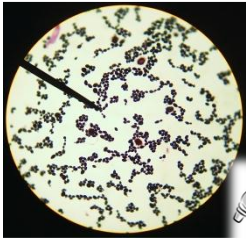
Mediante la cuantificación de las bacterias en la orina es posible diferenciar la contaminación de la verdadera infección del tracto urinario.

Las asas calibradas son una manera simple de examinar cuantitativamente las características bacteriológicas de una muestra de orina. Las asas calibradas de 2mm y 4mm se utilizan para sembrar en las cajas con agar. Después de incubar a $37^{\circ}\text{C}/24\text{hrs}$ se cuenta el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se calcula el número de organismos presentes en 1m de muestra multiplicando el recuento de colonias por 10^2 o 10^3 respectivamente. Los medios diferenciales permiten el aislamiento y la identificación de cultivos mixtos de una manera rápida.

El criterio de infección urinaria cuando se presentan 10^5 UFC/mL es aplicable únicamente a enterobacterias. Bacteria grampositivas, hongos y otras con requerimientos de crecimiento más difíciles, pueden encontrarse en menores concentraciones. El tipo de bacteria aislada ayuda a diferenciar entre una contaminación y una verdadera bacteriuria. Muestras con recuentos de 10^4 bacterias/mL generalmente contienen microorganismos saprofitos de la piel. Un 90% de las muestras presenta en cultivo enterobacterias que tienen más de 10^5 /mL. Un recuento alto de colonias con más de una especie, de una persona asintomática, generalmente indica contaminación.

Pacientes con síntomas de una infección urinaria y una concentración de 10^5 UFC/mL o más, tiene una probabilidad del 95% de verdadera bacteriuria. Cuando hay concentraciones de 10^5 /mL, pero hay frecuencia, urgencia y disuria, en mujeres hay una probabilidad del 33% de tener una infección bacteriana. Un valor menor de 10^2 enterobacterias/mL es evidencia en contra de una infección en tracto urinario.

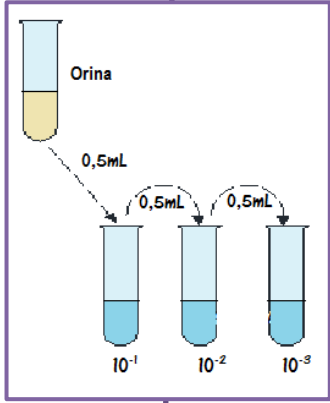
DIAGRAMA DE TRABAJO



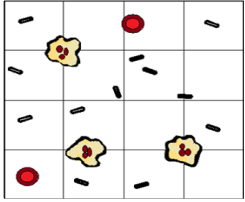
Examen microscópico, realizar Tinción de Gram y observar carga microbiana.



Carga microbiana baja

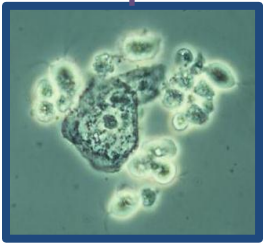


Presencia de:
Leucocitos,
eritrocitos
Células epiteliales



Sembrar con asa calibrada de 2 o 4mm e incubar 37°C/24hrs

Gota suspendida.
Verificar presencia de
Trichomona vaginalis
Tomando en cuenta si se realizaron diluciones decimales.



Agar Sangre



MacConkey
E.coli, Proteus, Klebsiella.



Brolacin
E.coli

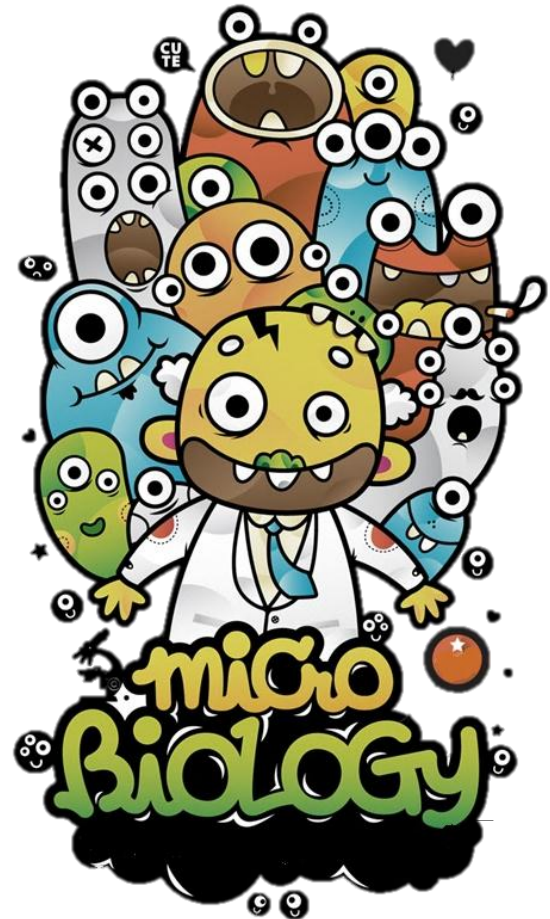


Sales Manitol
Staphylococcus



Biggy/SDA
Candida albicans

MICROESTANDARIZADOS



■ Objetivo:

Conocer los diferentes sistemas de identificación automatizados y manuales existentes en el mercado, realizar el procedimiento completo para el API20, para comparar el tiempo, material y espacio utilizados con respecto a los métodos convencionales.

INTRODUCCIÓN

SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN DE DETERMINACIONES MÚLTIPLES

Los microorganismos de los que se sabe que producen enfermedades infecciosas además de ser varios también tienen requerimientos nutricionales especiales y por lo tanto necesitan numerosas pruebas para su identificación.

La construcción de sistemas de identificación comerciales compactos, con reacciones químicas fácilmente visibles, tiempo de conservación prolongado y control de calidad estandarizada provista por los fabricantes, hacen muy convenientes su uso en los laboratorios de microbiología.

Aspectos generales:

- Su precisión ha probado ser comparable con la de los sistemas de identificación convencionales.
- El tiempo de conservación de sistema es prolongado, de 6 meses a 1 año, reduciendo así la caducidad de los medios.
- Requieren un mínimo de espacio para su almacenamiento e incubación.
- Son de uso fácil, su inoculación es simple con reacciones casi siempre claras dentro de las 24 horas y la disponibilidad de los registradores de archivos computarizados vuelve fácil y precisa la identificación.

Sistemas de identificación específicos.

API 20E

Este sistema tiene una base de datos que incluye Cepas comunes y atípicas. Consiste en una banda de plástico con 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación de plástico que cierra laxamente. Cada cúpula tiene un agujero pequeño en la parte superior a través de la cual se inocula la suspensión bacteriana con una pipeta durante la incubación el metabolismo bacteriano produce cambios de color espontáneos o revelados por la adición de reactivos, las reacciones se leen de acuerdo al Índice de Perfil Analítico, que puede utilizarse en forma manual o con ayuda computarizada.

Sistema ID CRYSTAL

Es un método miniaturizado de identificación de enterobacterias no fermentadoras, que sirve para la identificación de bacterias aerobias gramnegativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* así como también bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de glucosa, aislados con mayor frecuencia. El equipo comprende:

Los análisis utilizados en este sistema están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos mediante sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación y oxidación se detectan mediante el uso de un indicador de pH.

La tapa contiene 30 sustratos deshidratados sobre los extremos de puntas de plástico. La base tiene 30 celdas para reacción. Se utiliza líquido de inóculo para llenar las celdas, cuando se alinea la tapa con la base y se produce un resalto, el inóculo de prueba rehidrata los sustratos desecados e inicia las reacciones de las pruebas, las pruebas utilizadas incluyen fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de distintos sustratos ligados a cromógenos.

Después de la inoculación, los paneles se incuban de arriba hacia abajo en una estufa sin CO₂ con una humedad del 40-60% durante 18-20 horas a 35-37°C. Después de la incubación se examinan las celdas para observar cambios de color. A cada resultado positivo se le asigna un valor de 4, 2 o 1, según la fila donde esté ubicado y a cualquier resultado negativo se le asigna un valor de 0 así, se genera un número de perfil de 10 dígitos, este y los resultados de la prueba para indol y oxidasa se ingresan en un ordenador para obtener la identificación.

Sistema MicroScan

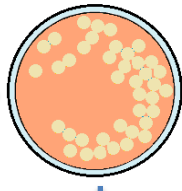
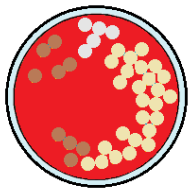
Consiste en bandejas de plástico para microtítulos con 96 celdas en las cuales se incluyen hasta 32 sustratos reactivos para la identificación de enterobacterias y otras especies bacterianas (existen paneles para grampositivos, gramnegativos y de las vías urinarias). Algunas bandejas denominadas Combo, incluyen también microdiluciones de algunos antibióticos para realizar pruebas de sensibilidad.

Los microtubos se inoculan con una suspensión del microorganismo y se incuban a 35°C durante 15 a 18 horas. Los paneles pueden interpretarse visualmente, después de lo cual los resultados bioquímicos son convertidos en un número biotípico de siete u ocho dígitos el cual indica la identificación del microorganismo por medio de un libro de códigos que proporciona el fabricante. O se puede utilizar un lector automático de bandejas para detectar el crecimiento bacteriano o cambios de color por diferencias en la transmisión de la luz.

Sistema Vitek

Es un sistema modular integrado que consiste en una unidad de llenado-sellado, lector-incubador, módulo de control computarizado, una terminal de datos y una impresora. El sistema detecta la proliferación bacteriana y los cambios metabólicos en las microceldas de las tarjetas delgadas de plástico asada en la fluorescencia. La tarjeta de identificación para los bacilos gramnegativos es una tarjeta con 64 celdas que contienen 41 pruebas bioquímicas fluorescentes, que incluye 18 pruebas enzimáticas para aminopeptidasas y oxidasas, 18 pruebas de fermentación, dos pruebas de descarboxilasa y otras tres pruebas. Los resultados son interpretados por la base de datos después de un periodo de incubación de 3 horas.

Siembra directa de la muestra



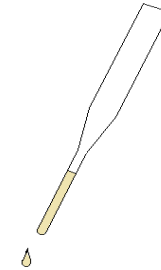
Aislamiento de la colonia a identificar.

Realizar Pruebas Bioquímicas 1^{as}.

DIAGRAMA DE TRABAJO SISTEMA API20



Preparar una suspensión bacteriana del microorganismo de prueba suspendiendo las células de una colonia bien aislada en 5mL de solución salina 0,85% estéril, comparando con un estandar 1,0 de McFarland.



1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX

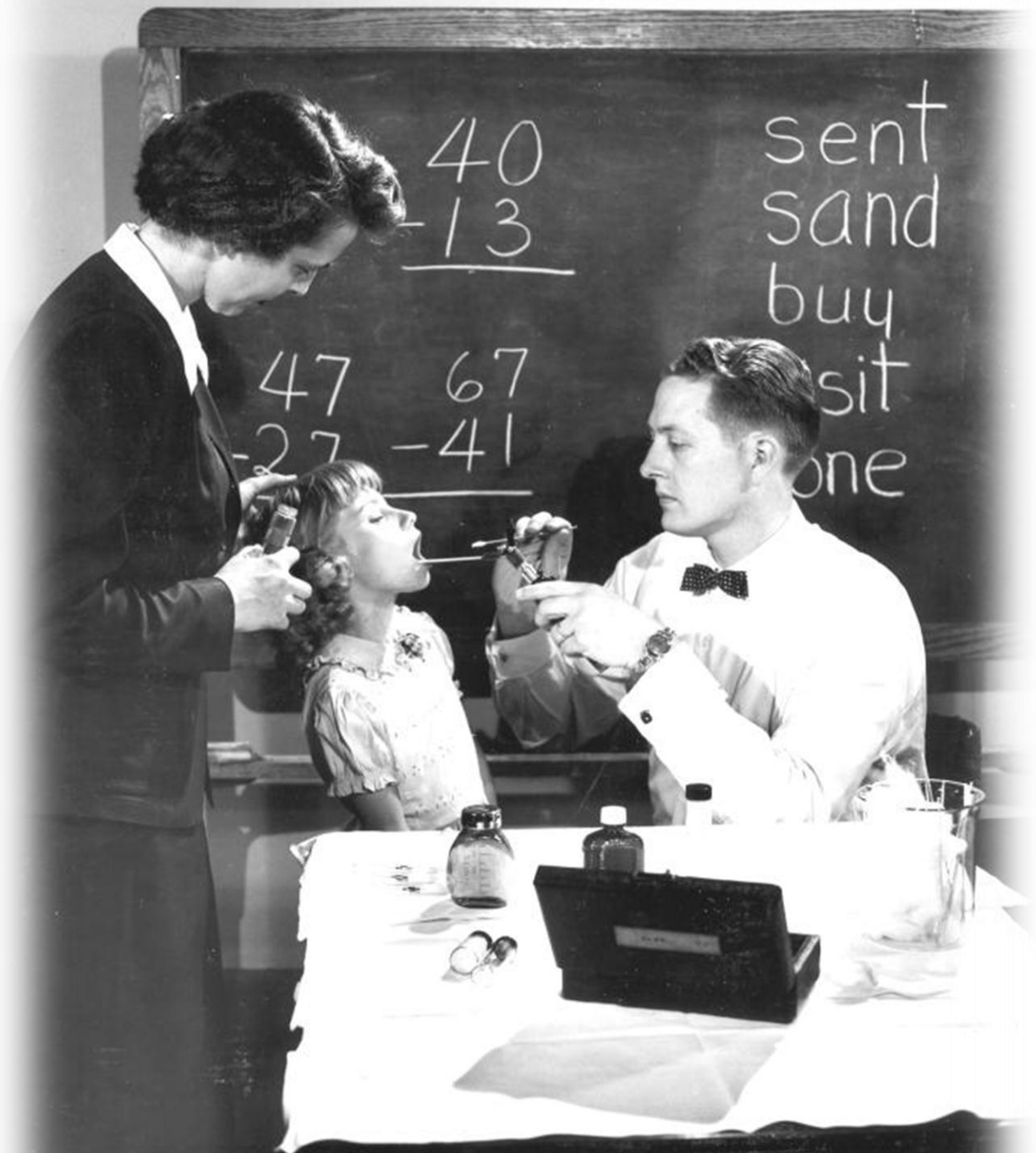
Con ayuda de una pipeta Pasteur, llenar cada cúpula con la suspensión bacteriana a través del agujero de inoculación. Recubrir las cúpulas de las tres descarboxilasas y de ureasa con vaselina estéril. Incubar el pánel a 35°C/5horas

Realizar la suma para obtener la puntuación de las pruebas positivas. El código obtenido permite la identificación de una bacteria concreta.

Perfil de identificación: 5144572 = *E. coli*

1	0	4	1	0	0	0	0	4	0	0	4	1	0	4	1	2	4	0	2	0
=5			=1			=4			=4			=5			=7			=2		

Exudado Faríngeo



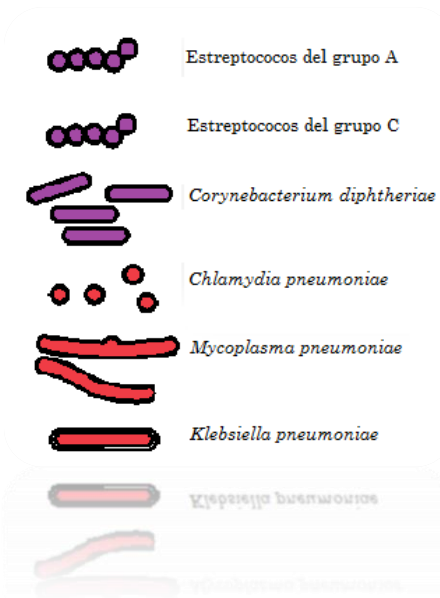
■ Objetivo.

Diferenciar los principales microorganismos patógenos implicados en la faringoamigdalitis, de los que forman la microbiota faríngea por sus características morfológicas y de crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

INTRODUCCIÓN

La faringoamigdalitis bacteriana aguda es un síndrome inflamatorio de la faringe y las amígdalas caracterizado por fiebre, odinofagia, malestar general, adenomegalias en el cuello, petequias en el paladar y presencia de eritema y/o exudado en faringe y amígdalas.

Se debe utilizar un hisopo de dacron o tratado con alginato de calcio para obtener las muestras faríngeas. Se deben tomar muestras de la zona de las amígdalas, la faringe posterior y de cualquier exudado o zona ulcerada. Es preciso evitar la contaminación de la muestra con saliva, dado que las bacterias de la saliva pueden proliferar en exceso e inhibir el crecimiento de los estreptococos de grupo A.



La mayoría de las infecciones bacterianas en faringe se deben a *Streptococcus pyogenes* (β -hemolítico del grupo A). También pueden encontrarse *Streptococcus* de los grupos C y G, *B. pertusis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Otras bacterias potencialmente patógenas, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, pueden estar presentes en la bucofaringe.

La muestra se toma con hisopo estéril de las áreas con exudado en la faringe y las amígdalas. Cuando se va a realizar la detección rápida de antígenos de *Streptococcus pyogenes* el hisopo se envía en un tubo seco, estéril, con tapa de rosca. Algunos laboratorios recomiendan colocar las puntas de los hisopos en un desecante (p.ej. gel de sílice) para evitar el crecimiento de flora comensal y mejorar el aislamiento. Cuando se va a remitir para cultivo bacteriano debe ir a temperatura ambiente en medio de transporte.

Los seres humanos constituyen el reservorio natural de los ***Streptococcus β -hemolíticos del grupo A***, y el microorganismo es transmitido de una persona a otra por vía respiratoria. La infección más frecuente causada por estos *Streptococcus* es la faringitis estreptocócica.

Streptococcus pyogenes del grupo A. Se transmite por un portador o individuo infectado, por medio de gotitas de saliva, por contacto directo o fómites. *S. pyogenes* se adhiere al epitelio de la faringe por medio del ácido lipoteicoico que cubre a los pilis.

En lactantes y preescolares se presenta en forma de nasofaringitis aguda, con exudación serosa muy fluida, poca fiebre, los ganglios linfáticos cervicales se encuentran muy inflamados; la infección tiende a extenderse hacia el oído medio (otitis media), la mastoides o las meninges.

En niños mayores y adultos la enfermedad es más aguda, se caracteriza por nasofaringitis aguda, amigdalitis, ganglios linfáticos cervicales inflamados y dolores, enrojecimiento y edema intensos en las mucosas con exudación purulenta con fiebre elevada.

Cuando se sospecha de estreptococos, la muestra para cultivo debe sembrarse en un medio apropiado que contenga sangre con una base de peptona.

Son cocos grampositivos que forman cadenas, no son móviles, su cápsula está compuesta de ácido hialurónico el cual impide la fagocitosis, son anaerobios facultativos y catalasa negativos.

Después de 18 a 24 horas de incubación en Agar Sangre, las colonias tienen aproximadamente 0,5mm de diámetro, son translúcidas y tienen una superficie lisa o mate. En general la zona de β -hemólisis tiene dos a tres veces el diámetro de la colonia. Las colonias son convexas y presentan un borde continuo.

La identificación se realiza por el tipo de hemólisis, prueba de sensibilidad a bacitracina, la actividad de la pirrolinidil aminopeptidasa (PYR) y la reacción con anticuerpos específicos.

Los *Streptococcus β -hemolíticos* diferentes de los del grupo A (**grupos C y G**) causan síntomas similares, pero más leves que las cepas del grupo A. A pesar que las cepas del grupo A pueden hallarse en pequeñas cantidades en la orofaringe, las cepas colonizantes regulares son las de los grupos C y G. Por lo tanto, el aislamiento de estos microorganismos es más difícil de interpretar. Si se les aísla como un cultivo puro o como flora predominante, se debe informar su presencia con la indicación de su significado clínico y la interpretación.

Streptococcus pneumoniae. Es la principal causa de neumonía bacteriana en la comunidad, sus manifestaciones consisten en un cuadro de escalofríos intensos y fiebre mantenida de 39°C a 41°C. La mayoría de los pacientes presenta tos con esputo hemoptísico, y generalmente dolor torácico.

La tinción de Gram de las muestras de esputo constituye un método rápido de diagnosticar la enfermedad estreptocócica. El neumococo es un coco grampositivo encapsulado, sus células tienen forma ovalada o de lanceta, y se dispone en parejas o cadenas cortas la morfología de sus colonias es variable. Las muestras de esputo se deben sembrar en un medio enriquecido con nutrientes y complementados con sangre como el Agar Sangre con 5 ug/mL de gentamicina, las colonias de las suelen ser grandes, redondas y mucoides, todas experimentan un proceso de autólisis con el paso del tiempo, el cual consiste en la disolución de la porción central de la colonia lo que origina un aspecto

de hoyuelo. Puede fermentar varios carbohidratos, siendo el ácido láctico el principal derivado metabólico.

Staphylococcus aureus. Los *Staphylococcus* son bacterias en forma de grano que se agrupan en racimos, son grampositivos, no forman esporas, pilis ni flagelos. *Staphylococcus aureus*, denominado así por sus colonias amarillas, es la bacteria más importante de este género ya que produce coagulasa, es catalasa positivo; fermenta con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico, pero no gas. Las muestras clínicas se deben inocular en medios complementados con sangre de carnero y agar Sal Manitol en donde sus colonias adquieren gradualmente una coloración dorada.

La característica más confiable para identificar *S. aureus* es la prueba de la coagulasa la cual puede llevarse a cabo en portaobjetos o en tubo. Este factor reacciona directamente con el fibrinógeno presente en el plasma y produce una rápida aglutinación de células bacterianas. La prueba puede llevarse a cabo con microorganismos provenientes de Agar Sangre, agar CNA u otros medios nutritivos no selectivos pero no a partir de medios con un alto contenido de sales.

Causa enfermedades mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. En aparato respiratorio puede producir: sinusitis, otitis, faringitis, y abscesos pulmonares o pleurales.

Haemophilus. Este género de la familia *Pasteurellaceae* está conformado por varias especies las cuales se encuentran presentes en la mayoría de las personas, colonizando principalmente las membranas del tracto respiratorio.

Haemophilus influenzae es la especie que se asocia con mayor frecuencia a enfermedad, y las infecciones en pacientes pediátricos eran las más frecuentes. Las cepas no capsuladas son patógenos oportunistas que pueden producir infecciones en los tractos respiratorios superior e inferior, constituye una de las principales causas de otitis crónica y aguda, y de sinusitis.

Estos microorganismos son bacilos gramnegativos. La mayoría de las especies de *Haemophilus* necesita medios complementados con factores de crecimiento como hemina (Factor X), Nucleótido de nicotinamida y adenina. Para el aislamiento de *H. influenzae* se utiliza Agar Chocolate, Agar Sangre, Agar Infusión cerebro-corazón con sangre, los cuales se incuban 37°C en atmósfera de 5 a 10% de CO₂ durante 24 h, presentando colonias pequeñas, lisas, convexas, grisáceas.

Chlamydia pneumoniae. Las clamidias son bacterias gramnegativas, pequeñas, parásitos intracelulares obligados y los seres humanos son los únicos hospederos conocidos. Es una causa importante de bronquitis, neumonía y sinusitis, infecciones que se transmiten de una persona a otra mediante las secreciones respiratorias.

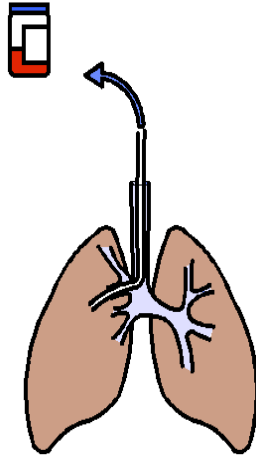
Su patogénesis depende del daño de los tejidos debido a la actividad del microorganismo y a los efectos de la respuesta inmune que induce. Se sabe que puede infectar y crecer en las células del músculo liso, células endoteliales de las arterias coronarias y los macrófagos.

Mycoplasma pneumoniae. Causa enfermedades del aparato respiratorio como la traqueobronquitis y la neumonía. Son peculiares debido a que carecen de pared celular y a la presencia de esteroides en su membrana celular. La ausencia de la pared confiere resistencia frente a penicilinas, cefalosporinas, vancomicina y otros antibióticos que interfieren en la síntesis de pared celular. Es aerobio estricto y necesitan esteroides exógenos que les proporciona el suero animal que se añade al medio de crecimiento, crecen lentamente.

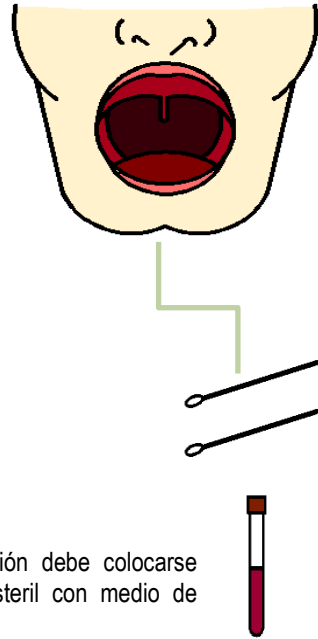
Moraxella. Las especies de *Moraxella* de importancia clínica son *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. osloensis*, *M. atlantae* y *M. catarrhalis*. Sus especies constituyen la flora normal sobre las superficies mucosas, se presentan más a menudo en el aparato respiratorio y menos en el aparato genital.

M. catarrhalis es un diplococo aerobio gramnegativo, que ha sido reconocido como patógeno importante en infecciones respiratorias como otitis media, sinusitis, bronquitis aguda y neumonía.

DIAGRAMA DE TRABAJO



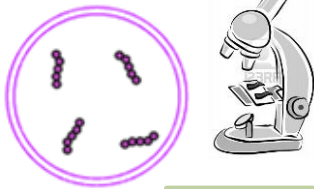
Luego de la recolección debe colocarse dentro de un tubo esteril con medio de transporte Stuart.



Toma de muestra. Indicando al paciente que abra bien la boca, con ayuda de un abatelengua se oprime la lengua, pasando el hisopo con un movimiento de barrido por las mucosas que se encuentran por detrás de la úvula y entre los pilares amigdalinos.

Debe tenerse la precaución de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal.

Tinción de Gram



Cultivo

Incubar a 37°C/ 24 h



Disco de bacitracina (10UI)

Agar Chocolate + polienriquecimiento, para el aislamiento de *Haemophilus Neisseria meningitidis*



Agar Sangre, realizar picaduras en la zona de estriado.

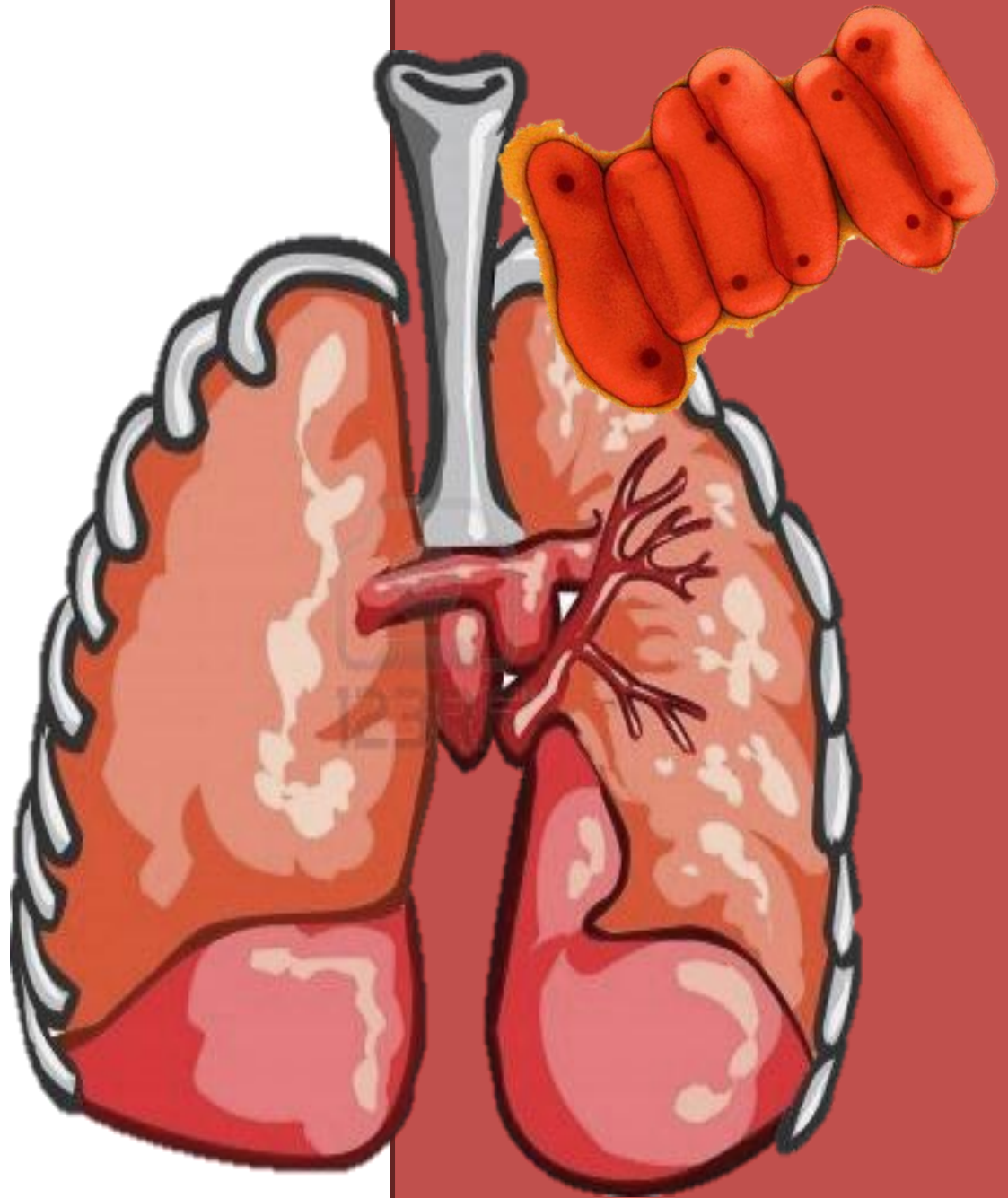


MacConkey para el aislamiento de *Klebsiella*



Salas Manitol, sembrado masivo para el aislamiento de *Staphylococcus*.

Mycobacterium



■ Objetivo:

Conocer los métodos de tinción, aislamiento y crecimiento a partir de muestras patológicas en los medios de cultivo adecuados para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium es un género de bacilos grampositivos que demuestra características acidorresistentes durante la tinción. *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* son los agentes etiológicos de la infección y la enfermedad tuberculosa. Esta puede evolucionar en forma crónica y afectar diferentes órganos, pero la localización más frecuente es la pulmonar. *Mycobacterium leprae*, es la causante de la lepra.

Las micobacterias son bacilos delgados curvos de 1 a 4 μm de longitud por 0.3-0.5 μm de anchura, que se tiñe de forma irregular, son aerobios obligados, sin motilidad, que no forman esporas. Tiene una pared celular compleja de alto contenido lipídico. De ella depende la ácido-alcohol resistencia; de ahí el nombre de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Adopta formas en N, L, V o semejan empalizadas o letras chinas, no forma esporas y es inmóvil.

Las cepas virulentas de *M. tuberculosis* forman "cordones serpentina" microscópicos en los cuales los bacilos se disponen en cadenas paralelas. Un "factor formador de cordones" inhibe la migración de leucocitos.

M. tuberculosis penetra en el organismo por vía aérea, rara vez lo hace por vía digestiva u otras como la cutánea, oftálmica, etc. Llevado por la corriente aérea hasta las zonas periféricas del parénquima pulmonar, alcanza en general la región subpleural.

Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis son de dos tipos: sistémicas, relacionadas con la infección, y locales, determinadas por el órgano o sistema comprometido.

Entre las manifestaciones sistémicas están fiebre, malestar general, pérdida de peso, diaforesis nocturna, anorexia, adinamia y una variedad de anormalidades hematológicas como anemia, leucocitosis o leucopenia. Anormalidades metabólicas como hiponatremia por secreción inapropiada de hormona antidiurética y trastornos neuropsicológicos como depresión.

Pretratamiento de las muestras

Debido a que la mayoría de las muestras proviene de zonas no estériles, es necesario recurrir a un pretratamiento adecuado (homogenización, descontaminación y concentración) antes de la tinción y siembra en los medios de cultivo.

Existen diversos procedimientos de descontaminación como:

- ▶ Método Petroff (hidróxido sódico). Agregar NaOH 4% hasta duplicar el volumen del esputo, el cual se agita en vortex y se deja actuar durante 5 minutos. Pasado este tiempo centrifugar 15min/ 3000RPM/ 25-35°C, dejar reposar 5 minutos, abrir el tubo y decantar el sobrenadante agregar buffer de fosfato hasta completar los 15mL. Agitar en vortex, centrifugar 15min/ 3000RPM/ 25-35°C, dejar reposar 5 minutos, decantar el sobrenadante, resuspender en buffer de fosfato hasta completar el volumen suficiente para sembrar en los medios que se empleen. Tener en cuenta que el tiempo de contacto con el descontaminante no debe exceder 30 minutos.
- ▶ Kubica. La N-acetil-L-cisteína es la sustancia mucolítica más utilizada, ya que permite trabajar con concentraciones más bajas de hidróxido sódico cuando se utilizan de forma más conjunta. La combinación N-acetil-L-cisteína más NaOH al 2% es el método de descontaminación-digestion mas recomendado para los sistemas de cultivo automáticos con medios líquidos.

Diagnóstico

La alta concentración de lípidos en la pared celular de la mayoría de las micobacterias las vuelve más resistentes a la destrucción por soluciones ácidas y alcalinas fuertes que otras bacterias que pueden estar presentes en la muestra. Las muestras que probablemente contengan una flora bacteriana mixta son tratadas con un agente descontaminante para reducir el sobrecrecimiento bacteriano indeseable y licuar el moco. Después del tratamiento con el descontaminante durante un periodo controlado, el ácido o el álcali utilizado se neutraliza y la mezcla se centrifuga a alta velocidad para concentrar las micobacterias.

Tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes

La búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes se realiza directamente en las muestras mediante tinciones. Comúnmente se utilizan dos tipos de tinciones:

- Tinciones de carbolfucsina: una mezcla de fucsina con fenol (ácido carbólico)
 - Ziehl-Neelsen (tinción caliente)
 - Kinyoun (tinción fría)
- Tinción con fluorocromos: auramina O sola o con el agregado de un segundo fluorocromo, la rodamina.

De acuerdo con el número de bacilos encontrados en la muestra se informa:

No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes	0 bacilos en más de 100 campos observados
No exacto de bacilos en 100 campos	De 1 a 9 bacilos en 100 campos observados
+	Entre 10 y 99 bacilos en 100 campos observados
++	1-10 bacilos por campo en 50 campos observados
+++	Más de 10 bacilos por campo en 20 campos observados

Manual de la OMS

M. tuberculosis necesita medios de cultivo complejos para su aislamiento. Es un aerobio obligado y su multiplicación es lenta. Tiene numerosos antígenos capaces de despertar una gran variedad de respuestas inmunes en el huésped, algunas de las cuales determinan el característico daño tisular que produce.

- Medio de agar semisintético (ej. Middlebrook): estos medios contienen sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico albúmina, catalasa, glicerol, dextrosa y verde de malaquita. La albúmina neutraliza los efectos tóxicos e inhibidores de los ácidos grasos en la muestra o el medio.
- Medios con huevo (ej. Löwenstein-Jensen, Stonebrink, Ogawa): contiene sales definidas, glicerol y sustancias orgánicas (huevo fresco o yema de huevo, harina de papa). Incluye verde de malaquita para inhibir otras bacterias.
- Medios de caldo (ej. Middlebrook y Dubos): apoyan la proliferación de inóculos pequeños.

Se utilizan varios medios, Lowenstein-Jensen es el de uso más frecuente, pero también Ogawa-Kudo, caldo de Dubos y los agares 7H10 y 7H11. El cultivo es necesario también para la identificación de la especie y para efectuar las pruebas de sensibilidad a medicamentos. El crecimiento de *M. tuberculosis* en medios de cultivo convencionales es lento, en promedio de 4-6 semanas. Un método rápido de cultivo es el agar de capa delgada de Middlebrook 7H11 suplementado. Este por ser un agar traslúcido, permite visualizar el crecimiento inicial de las colonias utilizando un microscopio convencional.

Características fenotípicas por medio de las cuales se puede realizar una identificación de *M. tuberculosis*:

- Formación de colonias no pigmentadas, rugosas de color beige después de 14 a 28 días de incubación a 37°C en los medios Löwenstein-Jensen o de Middlebrook.
- Acumulación de niacina.
- Reducción de nitratos a nitritos.
- Capacidad para crecer en presencia de hidracina de ácido tiofeno-2-carboxílico (T2H)

- Catalasa negativa.

Otros métodos utilizan medios de cultivo líquidos y la detección de crecimiento por la producción de CO₂ o el consumo de oxígeno por el microorganismo.

Prueba de la tuberculina

Esta prueba mide DTH con respecto a un estándar internacional de referencia el cual es una preparación de tuberculoproteína denominada PPD (derivado proteico purificado). Esta prueba implica la inyección intradérmica que se analiza 48 a 72 horas después. Un área de induración \geq 10mm, acompañada de eritema, constituye una reacción positiva, así como la ausencia de la induración indica una reacción negativa.

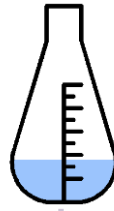
Uso de instrumentos automatizados

Para el aislamiento de micobacterias en esputo y otras muestras, se ha implementado el uso de sistemas automatizados como BATEC 460[®], BATEC Mycobacteria Growth Indicator Tube[®]

DIAGRAMA DE TRABAJO

Preparar el acetilcisteína-álcali: 50mL de citrato trisódico (2,94%) con 50mL NaOH (4%).

Agregar N-acetil-L-cisteína (NALC), inmediatamente antes del uso.



Agregar la mezcla digestiva de NALC en un volumen igual al de la muestra (no más de 5 mL), en tubos de centrifuga de plástico de 50mL con tapa.

Homogenizar la mezcla durante 15-20', permitir que sedimente a temperatura ambiente durante 15-20'.

Agregar un buffer de fosfatos (pH=6.8), hasta los 50mL y mezclar.



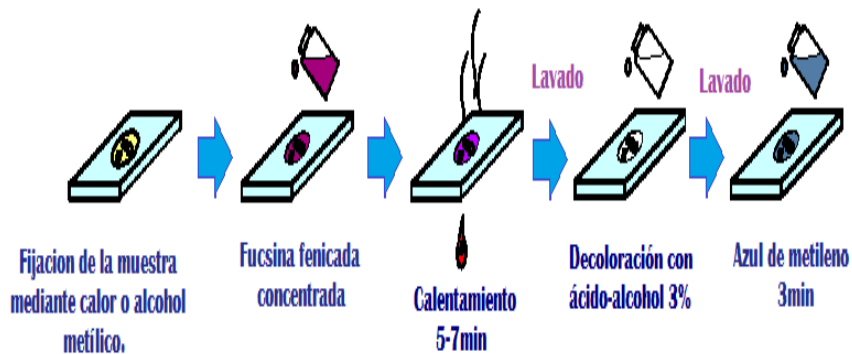
Concentrar la muestra por centrifugación a 2000-3000rpm/15-20'.

Decantar.

Agregar de 1-2mL de buffer de fosfatos para resuspender el sedimento.



Tinción de Ziehl- Neelsen



Medio inclinado de Löwenstein-Jensen



Agar Middlebrook 7H10

Exudado Cérvico-Vaginal/Uretral



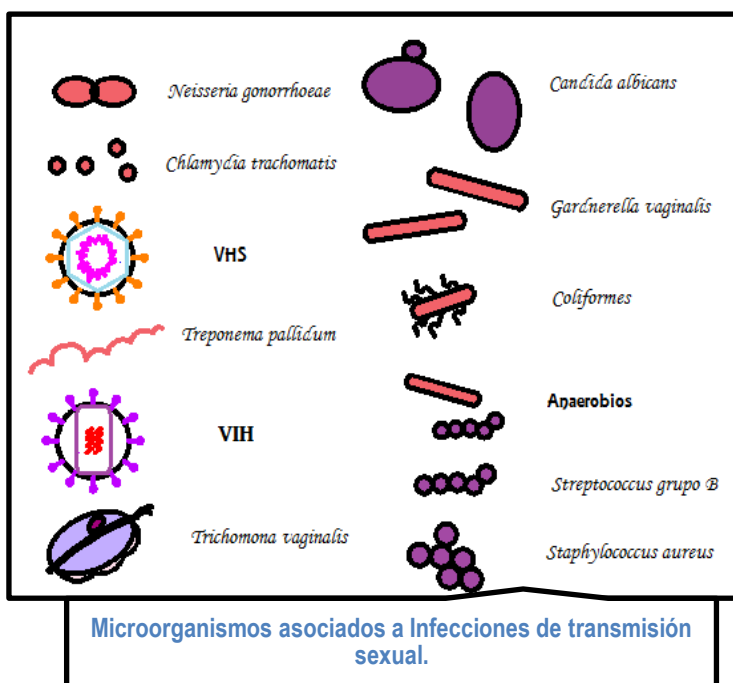
■ Objetivo

Reconocer e identificar los principales agentes etiológicos en enfermedades en el tracto genital femenino y masculino, y la metodología implicada para un adecuado diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

El aparato genital está formado por órganos externos e internos en ambos sexos. En las mujeres los genitales internos son los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, el cuello uterino y la vagina, y los genitales externos son los labios. En hombres está compuesto por pene, testículos, epidídimo, uretra, conducto eyaculatorio, próstata y vesícula seminal.

Las enfermedades de transmisión sexual, como las causadas por clamidias y gonococos, son cuadros bien conocidos de manera que, en las personas que presentan un primer episodio de alguna enfermedad como vaginitis, su diagnóstico y tratamiento suelen ser sencillos. Sin embargo en pacientes que se han infectado durante el coito, es necesario el seguimiento de las parejas sexuales para identificar y eliminar las infecciones también en estas.



Las causas del exudado vaginal son la vaginosis bacteriana, la candidiasis causada por levaduras del género *Candida* y la tricomoniasis causada por *Trichomona vaginalis*.

Vaginitis. Inflamación de las paredes de la vagina. Las manifestaciones clínicas de la vaginitis dependen del agente responsable estos pueden ser *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus* del grupo A, *Shigella spp*, *Trichomona vaginalis* y *Cándida spp*, difieren con el influjo hormonal sobre el epitelio vaginal. En la vaginitis por *Cándida* (candidiasis

vulvovaginal), el síntoma más común es el prurito acompañado o no de flujo vaginal, y cuando este está presente puede ser de aspecto muy variable: desde acuoso hasta grumoso u homogéneamente espeso.

Vaginosis bacteriana. Es la causa más frecuente de flujo y mal olor vaginales. El flujo se describe como blanco, homogéneo, no inflamatorio. En cuanto al olor, se le compara con el olor del pescado.

El agente etiológico responsable es la flora bacteriana vaginal, que se compone principalmente de anaerobios (*Prevotella spp* y *Mobiluncus spp*), *Gardnerella vaginalis* y *Mycoplasma hominis*.

Gardnerella vaginalis. Esta bacteria actúa en realidad de manera sinérgica con bacterias aerobias del género *Bacteroides*, *Peptococcus* y *Mobiluncus* para producir la secreción característica con mal olor.

Cervicitis mucopurulenta. Existen dos formas de cervicitis (inflamación del cuello uterino): endocervicitis y exocervicitis. La endocervicitis también conocida como cervicitis mucopurulenta caracterizada por un exudado purulento visible en el canal endocervical. Sus manifestaciones son flujo vaginal amarillento, acompañado o no de sensación de presión o molestia pélvica.

Generalmente la **endocervicitis** es causada por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, pero existen otros agentes como estreptococos del grupo B y actinomicetos asociados al dispositivo intrauterino.

Para clamidia introducir el aplicador en el cuello y rotarlo contra las paredes para obtener células epiteliales.

La muestra para gonococo se obtiene introduciendo el aplicador en el endocervix y rotando contra las paredes del cuello de modo que se impregne de moco. El cultivo se realiza en medios de GC o Thayer Martin, en atmósfera de CO₂ y un 70% de humedad.

Realizar identificación por el aspecto de las colonias, Gram, oxidasa y maltosa, IF directa. Comprobación de la producción de betalactamasas.

La **exocervicitis** es causada principalmente por herpes virus, *T. vaginalis* y *Candida spp*.

Entre las infecciones en el órgano reproductor masculino, podemos mencionar la epididimitis, prostatitis y orquitis.

Epididimitis. Es una inflamación del epidídimo, se observa frecuentemente en los varones sexualmente activos, sus síntomas son fiebre con dolor y tumefacción de los testículos. *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* son la causa común, sin embargo los estafilococos entéricos y coagulasa negativos también pueden causar esta infección en varones mayores de 35 años, en homosexuales, esta infección a menudo se asocia con obstrucción uretral por la glándula prostática.

Prostatitis. Cuadro clínico de los varones adultos que tienen dolor perineal, lumbar o en la parte inferior del abdomen, malestar urinario o síntomas asociados con la eyaculación. La prostatitis se produce por causas infecciosas y no infecciosas. Las pacientes con prostatitis bacteriana aguda presentan disuria y polaquiuria.

Las causas más comunes de estas infecciones son similares a las causas bacterianas de las infecciones urinarias bajas, como *Escherichia coli*.

Sífilis o chancro duro. Enfermedad venérea causada por *Treponema pallidum* caracterizada por una o múltiples úlceras indoloras, de bordes levantados y fondo limpio, acompañadas generalmente de adenopatía inguinal.

Para recolectar la muestra limpiar la superficie con solución salina, si la costra está presente es necesario removerla, presionar la base de la ulcera, hasta la aparición de un líquido claro, tocar el fluido con la placa de vidrio, cubrir con un portaobjetos. El diagnóstico se realiza inmediatamente examinado con el microscopio de campo oscuro, y por pruebas serológicas como VDRL o RPR. Observación por tinciones especiales (argénticas, Vagó).

Chancroide o chancro blando. Enfermedad caracterizada por una o múltiples úlceras dolorosas, de fondo sucio de aspecto purulento, bordes irregulares, acompañadas de adenopatías inguinales también dolorosas, su agente etiológico es *Haemophilus ducreyi*.

Para el diagnóstico irrigar con 0,5mL de solución salina y aspirar con una pipeta Pasteur. Con un aplicador humedecido en solución salina, raspar la base de la lesión. El Gram del raspado muestra bacilos gramnegativos en empalizadas o “banco de peces”.

Inocular directamente en agar chocolate o agar sangre de conejo más Vancomicina (3µg/mL) o BHI, a 33°C y en atmósfera de CO₂ entre 5 y 10%, o un medio de transporte que contenga tioglicolato en base de hemina y combinaciones de dióxido de selenio, albúmina y glutamina, el cual permite conservar la muestra hasta por 4 días a 4°C.

Linfogranuloma venéreo. Enfermedad de transmisión sexual causada por *Chlamydia trachomatis* caracterizadas por una pápula pequeña que se ulcera y desaparece espontáneamente para reaparecer con el trascurso de los años como una linfadenopatía inguinal usualmente unilateral.

La técnica de recolección consiste aspirar el pus del nódulo linfático fluctuante, cuando el nódulo no es fluctuante inyectarle una pequeña cantidad de solución salina y aspirar.

Tinción de Giemsa o IF directa. Se cultiva en células McCoy, HeLa, HL, Hep-2 o de riñón de mono y demostración de los cuerpos de inclusión en el citoplasma celular (Lugol, Giemsa, IF con anticuerpos monoclonales).

DIAGNÓSTICO

Recomendaciones previas a la toma de muestras del tracto genital femenino

- Haber terminado la menstruación por lo menos 4 o 5 días antes.
- Abstención al menos de 48 horas.
- No realizar exploración bimanual antes de la toma.
- Conviene que la vejiga esté vacía.
- No usar tratamientos tópicos (óvulos, espermicidas, cremas vaginales, etc) 6 días previos a la toma de muestra.

Exudado vaginal.

- Para la obtención de muestra usar un espéculo sin lubricante. En niñas se puede tomar directamente la muestra de flujo vaginal.
- Recolectar la muestra de la mucosa del canal vaginal alto con un aplicador o una pipeta.
- Preparar un examen directo con solución salina para observar si hay presencia de T. vaginalis.
- El Gram del flujo vaginal permite observar células tachonadas por cocobacilos variablemente teñidos.
- Al mezclar el flujo vaginal con KOH al 10% se puede desprender olor a pescado; es la prueba de aminas positiva.
- Realizar inoculación en medios de cultivo selectivos según los microorganismos buscados.

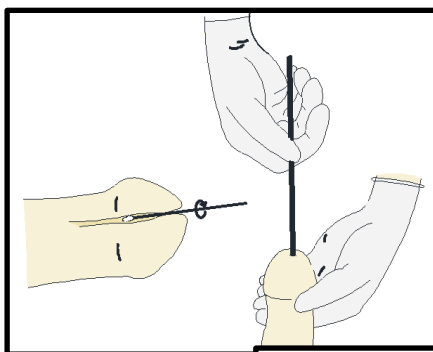


Recomendación previa a la toma

- La muestra debe recogerse antes de la primera micción de la mañana o deberá pasar al menos 1hr después de la última micción

Exudado uretral.

- Retraer el prepucio y limpiar el meato uretral con gasas estériles empapadas de solución salina.
- Pedir al paciente que ordeñe suavemente el pene, con lo que aparecerá un líquido de aspecto lechoso en el meato uretral.
- Recoger el líquido dejando caer el exudado sobre la torunda sin tocar la piel.



- Realizar tinción de gram y sembrar inmediatamente en los diferentes medios de cultivo.

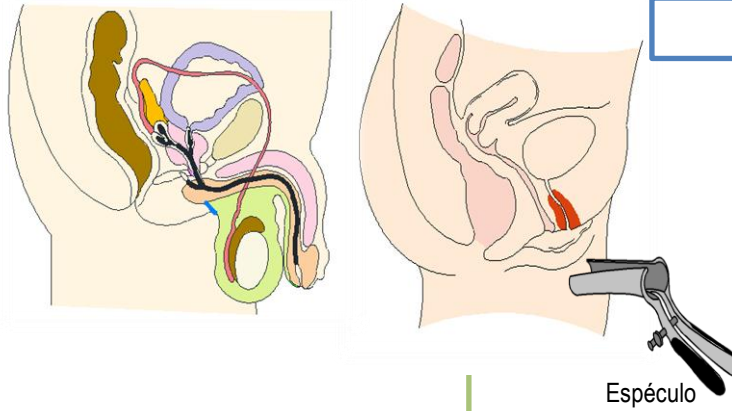
En caso de no obtener exudado:

- El paciente debe estar colocado en decúbito supino.
- Retraer el prepucio y limpiar el meato uretral.
- Insertar la punta del hisopo hasta penetrar 2cm (3-5cm si se sospecha de Chlamydia trachomatis girando 360° para desprender algunas células epiteliales, debido a que es un microorganismo

intracelular) en la uretra anterior. El hisopo debe dejarse colocado por unos segundos.

- Retirar el hisopo y proceder a teñir y sembrar.

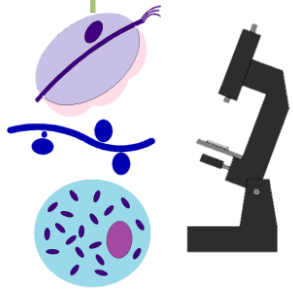
DIAGRAMA DE TRABAJO



Examen microscópico:

En fresco para detección de *Trichomona vaginalis*.

Tinción de Gram, observar si hay presencia de levaduras, clue cells.



Cultivo

37°C/24 hrs

Prueba de KOH al 10%
para *Gardnerella vaginalis*



Agar Tayer-Martin,
para Neisseria



Agar
Chocolate



Agar Cassman,
para
Gardnerella



Agar Sangre



Agar Sales Manitol,
para
Staphylococcus



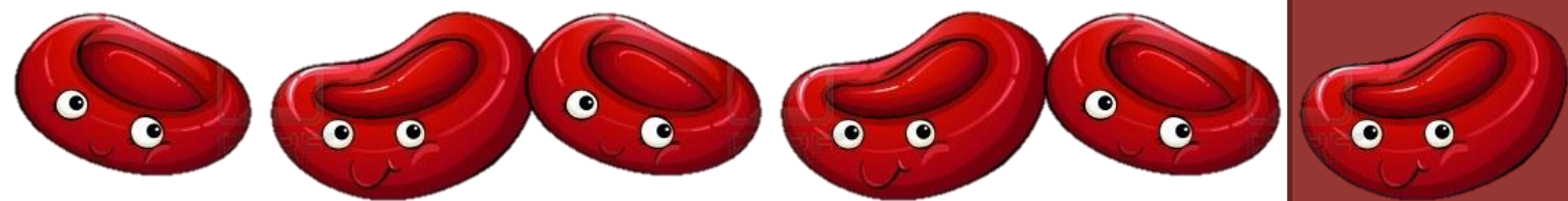
MacConkey,
enterobacterias



SDA, para
levaduras

Anaerobiosis
37°C/48hrs/CO₂ al 10%

HEMOCULTIVO



■ Objetivo

Conocer la metodología para realizar un hemocultivo, tomando en cuenta la importancia de una adecuada toma de muestra, para identificar el microorganismo causante de la bacteremia o septicemia.

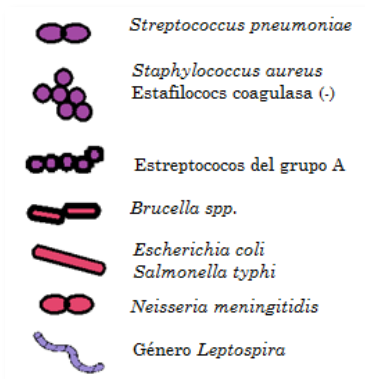
Introducción

La bacteremia es un estado en el que la bacteria circula a través del sistema vascular. Los signos y síntomas pueden estar presentes, pero son variables. La ausencia de signos y síntomas en los pacientes, define un trastorno denominado “silencioso o subclínico”. Por el contrario, la septicemia es un síndrome clínico caracterizado por fiebre, escalofríos, malestar, taquicardia, hiperventilación y toxicidad o postración. Esta ocurre cuando las bacterias circulantes se multiplicaron a una velocidad que excede su eliminación por los fagocitos. Los síntomas aparecen como consecuencia de la presencia de toxinas microbianas o citosinas producidas por las células inflamatorias.

Los hemocultivos están indicados en presencia de una enfermedad febril seria que puede requerir tratamiento con antibióticos o cuando una infección en un sistema de órganos podría dilucidarse por medio del aislamiento del patógeno a partir de la sangre (p.ej. meningitis o neumonía).

Hemocultivo: sangre obtenida de una sola punción o a través de un catéter e inoculada en una o más botellas o tubos de cultivo de sangre.

Ejemplo de microorganismos que se pueden aislar a partir de un hemocultivo:



Meningitis bacteriana. Es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Neisseria meningitidis*, que se presenta en forma esporádica o epidémica. Luego de la colonización de la mucosa nasofaríngea por el meningococo, se produce la invasión local a la que le sigue la bacteriemia, a través de esta vía se produce la colonización meníngea y la replicación bacteriana en el espacio subaracnoideo. Los síntomas del síndrome meníngeo: cefalea, náuseas, vómito, contracturas, fiebre, rigidez de nuca, etc. Existen dos manifestaciones cutáneas la erupción purpúrica y el herpes simple peribuca. El diagnóstico de certeza se realiza a través del examen de LCR, cuyo aspecto es turbio o purulento, el examen microscópico del sedimento muestra diplococos gramnegativos, también se solicitan hemocultivos y cultivos de secreciones faríngeas, con el objeto de aislar la bacteria.

Fiebre tifoidea. Enfermedad infecciosa aguda, causada por *Salmonella typhi*. Se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, estado tóxico, compromiso de la conciencia, diarrea o constipación, dolor abdominal, vómitos, debilidad, exantema maculoso y esplenomegalia. El diagnóstico definitivo se hace por aislamiento en los hemocultivos, durante el periodo febril, durante la primera semana es

positivo en un 90% de los casos, también se puede observar aumento leve y transitorio de algunas enzimas (p.ej. TGO, Fosfatasa Alcalina).

Brucelosis. También denominada fiebre ondulante, fiebre de Malta y enfermedad de Bang. Afecta a numerosos animales y se transmite al hombre por exposición ocupacional, accidental o por el consumo de lácteos o carnes crudas. Puede comenzar como una enfermedad febril aguda o en forma insidiosa. El síndrome febril se completa con escalofríos, sudoración profusa, cefalea y artromialgias. El aislamiento bacteriológico puede provenir de sangre, medula ósea, LCR. Los hemocultivos son de elección en el periodo agudo. Las bacterias pertenecientes al género de Brucella son bacilos cortos gramnegativos, no esporulados e inmóviles, son aerobios, catalasa y oxidasa positivos, no licuan la gelatina ni lisan los glóbulos rojos, reducen el nitrato, producen H₂S y hidrolizan la urea en forma variable, RM-VP y citrato negativa, su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, en un pH de 6,6 a 7,4.

Leptospirosis. Enfermedad zoonótica que se manifiesta por un espectro signsintomático, que abarca desde formas gripales, poco diferenciadas, a síndromes que indican la agresión pluriparenquimatosa, con ictericia, insuficiencia renal, hemorragias, meningitis y neumonía. Su diagnóstico microbiológico se basa en la recuperación del microorganismo. Las leptospiras son microorganismos delgados, de 0,1 µm de diámetro por 8 a 20 µm de largo. Solo son visibles por medio de microscopia de fondo oscuro. Su crecimiento es lento, los medios de cultivo requieren el agregado de suero de conejo o de ácidos grasos de cadena larga, además de otras sustancias (Tween 80, albumina bovina, etc). Para hemocultivo a la sangre se le agrega oxalato de sodio o heparina.

Aspectos a considerar para un hemocultivo.

- Para la obtención de muestra es importante seleccionar un sitio diferente para cada hemocultivo, en la asepsia de la piel se recomienda un agente bactericida como alcohol isopropílico o etílico al 70%, continuar con tintura de yodo, sin volver a palpar el sitio de punción.
- Las muestras se deben obtener, si es posible, antes de la utilización sistémica de antibióticos. Como la fiebre es a menudo una respuesta retrasada respecto del ingreso de las bacterias en el torrente sanguíneo, por lo tanto, es recomendable recolectar muestras lo antes posible tras la aparición de la fiebre.
- El volumen es una variable muy importante, como en adultos el número de microorganismos está en el rango de < 1 a 10 UFC/mL, el volumen de sangre recomendado es de 20 a 30 mL.

En la población infantil:

- En menores de 4 Kg: de 0,5 a 1mL por tubo
- De 1 a 6 años: mL por año de edad
- Entre 15 a 40Kg: 10 a 20 mL, divididos entre los dos cultivos de sangre en ambos casos.

- ☑ Los medios utilizados en los hemocultivos son polivalentes y enriquecidos nutricionalmente. Suelen emplearse hidrolizado de soya o soya tripticaseína, peptona suplementada, infusión cerebro-corazón, agar Columbia CNA y los caldos Brucella.

La mayoría de los medios de hemocultivo contienen SPS (Polianetol Sulfonato Sodico) como anticoagulante, inactiva los neutrófilos y ciertos antibióticos y precipita al fibrinógeno, lipoproteínas, globulinas y otros componentes del complemento sérico. También puede inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, este efecto puede neutralizarse con el agregado de gelatina al medio en una concentración final de 1%.

Muchos frascos de hemocultivo incorporan resinas sintéticas que inactivan el efecto antibiótico.

- ☑ Factor de dilución. Como la sangre contiene elementos como lo son el complemento, lisozimas, leucocitos y en caso de que el paciente le haya sido administrado algún antimicrobiano, se debe diluir adecuadamente, la relación sangre-caldo final recomendada está entre 1:5 y 1:10 (v/v).

- ☑ **Las señales visibles de crecimiento en las botellas de hemocultivo son:**

Hemólisis: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lysteria spp*, *Clostridium*, *Bacillus spp*.

Turbidez: bacilos gramnegativos aerobios, *Staphylococcus*, *Bacteroides spp*.

Formación de gas: bacilos gramnegativos aerobios, anaerobios.

Formación de película: *Pseudomonas spp.*, levaduras, *Bacillus spp*.

Coagulación: *Staphylococcus aureus*.

Colonias visibles: *Streptococcus*, *Staphylococcus*.

Sistemas de procesamiento de hemocultivo

Sistemas Manuales.

Son variaciones de los clásicos frascos de agar-caldo. *El sistema Signa® de Oxoid*. Es un sistema de frasco único que utiliza la producción de CO₂ para detectar el crecimiento bacteriano temprano. Este sistema emplea una segunda cámara de plástico (cámara de señal), con una aguja larga que llega hasta el fondo del frasco. Luego de inocular la muestra dentro del frasco principal, se conecta la cámara de señal por medio de la inserción de la aguja a través del tapón de goma y se ubica por debajo de la superficie del medio de cultivo. Las bacterias producen CO₂ cuando crecen y metabolizan. El aumento de presión resultante empuja el líquido dentro de la cámara de señal, que puede visualizarse directamente y, además, utilizarse para tinción de Gram y subcultivo.

Sistema BBL Septic-Chek®, es un sistema de agar bifásico, que consta de un frasco de cultivo estándar que contiene caldo con infusión de cerebro-corazón o caldo soya-tripticaseína. El frasco está diseñado para conectarse a una segunda cámara de plástico que contiene una paleta con la superficie recubierta de agar. Después de inocular el primer frasco, se enrosca el portaobjetos contenido en la cámara plástica, este tiene una paleta de tres superficies recubiertas con tiras de agar Chocolate, MacConkey y extracto de malta. El primer subcultivo se realiza luego de 4 a 6 horas de

incubación a 35°C invirtiendo el frasco lo que permite el ingreso del medio en la cámara, y por lo tanto, moja las superficies recubiertas con agar.

Los frascos de hemocultivo se deben incubar a 35°C y examinar visualmente para observar el crecimiento durante las primeras 6 a 18 horas. Para los sistemas que utilizan caldos convencionales, se deben examinar los frascos contra tubos de luz fluorescente o con luz transmitida incandescentemente. Se deben realizar subcultivos en agar chocolate de todos los frascos dentro de las 12 a 24 horas de recolección, a partir de la cual las placas se incuban en forma aerobia en una atmósfera de 5-10% de CO₂ a 35°C. En general se deben realizar cultivos aerobios y anaerobios de todos los frascos de cultivo que fueron visiblemente positivos. En circunstancias normales no es necesario incubar más de 7 días.

Sistema de Hemocultivo por lisis y centrifugación.

El sistema Isolator®, es muy útil para el aislamiento de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales y de crecimiento lento. El Isolator Microbial System® es un tubo especial que contiene saponina (sustancia que lisa eritrocitos y leucocitos). Se agregan de 7,5 a 10mL de sangre y se mezcla varias veces por inversión. Luego se coloca el tubo en una centrífuga y se centrifuga a 300rpm/15'. Después se aspira el sedimento y se subcultiva en el medio apropiado.

Es un método de elección cuando se requieren hemocultivos cuantitativos, ya que las UFC/mL pueden calcularse a partir del volumen de sangre procesado y el número de colonias presentes en la superficie del agar.

Sistemas automatizados e informatizados.

Los sistemas más utilizados son: **BacT/Alert®**, y **BACTEC**, la tercera generación de estos últimos permiten la monitorización continua, rápida detección, un inóculo estándar, no requieren incubadora, agitador, ni cilindros de gas. El funcionamiento de estos se basa en la detección del CO₂ que cambia el pH, acompañados por medio de colorimetría en el BacT/Alert y por sensor fluorescente en el BACTEC. Estos equipos monitorizan las botellas cada 10 minutos y las agitan 34 y 30 veces por minuto respectivamente. Cuando uno de estos sistemas alerta que es positivo, se pueden retirar los frascos de interés para realizar una tinción de Gram y un subcultivo. El medio que se selecciona para el subcultivo puede elegirse en base a los resultados obtenidos de su morfología mediante la tinción de Gram.

TREK ESP Culture System II® Difiere de los otros dos sistemas en los siguientes aspectos: la producción de CO₂ se monitoriza en forma manométrica, se monitoriza el consumo y la producción de gas y se detectan los cambios en la concentración de H₂ y O₂, además de CO₂.

Otros líquidos corporales estériles que se pueden manejar como un hemocultivo.

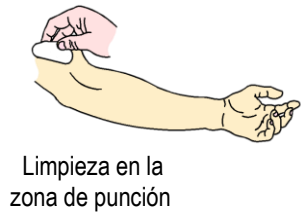
- Los cultivos de *médula ósea* pueden ser útiles para establecer el diagnóstico de enfermedades granulomatosas, como brucelosis, histoplasmosis y tuberculosis. La utilización del sistema Isolator® para procesamiento de médula ósea mejora el aislamiento de las bacterias, en particular si las infecciones están causadas por microorganismos intracelulares.

- *Líquido pleural*. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia son los anaerobios, neumococo y *Staphylococcus*. Para su diagnóstico debe practicarse una toracocentesis o punción de la cavidad pleural.
Para el estudio bacteriano rutinario es suficiente de 1 a 10mL, en el caso de sospecha de micobacterias u hongos el volumen deberá ser superior a 10mL. Los recipientes idóneos para el transporte son tubos estériles de tapón de rosca o presión negativa sin conservadores.

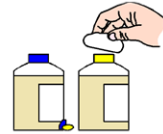
- *Líquido peritoneal*. La mayoría de la peritonitis se debe a flora normal del epitelio, *Staphylococcus epidermidis* y *aureus*, y en pequeño porcentaje por bacterias gram negativas procedentes del intestino. La cantidad mínima de muestra debe ser de 10mL, colocada en tubos de rosca. Se realiza una tinción de Gram, recuento leucocitario y se procederá a sembrar en medios de cultivo.

- *Líquido articular*. La extracción de la muestra se realiza mediante punción articular, como coagula con facilidad, se recomienda la inoculación de 10mL en frascos de hemocultivo con SPS o dentro del sistema Isolator®, se realiza tinción de Gram, si se sospecha de artritis tuberculosa, realiza tinción de Ziehl-Neelsen. Su cultivo se realiza en medios aerobios, anaerobios, y específicos como Thayer-Martin (gonococos), Löwenstein (micobacterias), Castañeda (*Brucella melitensis*).

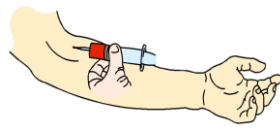
DIAGRAMA DE TRABAJO



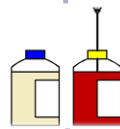
Limpieza en la zona de punción



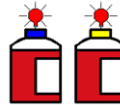
Quitar los tapones de los frascos de hemocultivo y desinfectar los tapones de goma.



Extracción de sangre



Introducir el volumen recomendado de sangre en cada uno de los frascos, comenzando con el de anaerobios para evitar transferir a este frasco el aire que pueda quedar atrapado en la jeringa.



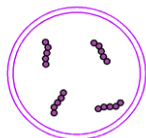
Sistema manual

Incubación a 37°C/12-48h, aparición de la señal.

Los hemocultivos sin signos de crecimiento se incubaran durante 5-7 días. Si se sospecha de microorganismos de crecimiento lento se prolongará hasta 28 días.



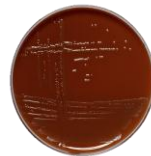
Extracción de la muestra del frasco positivo



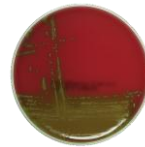
Examen microscopico
Tinción de Gram



Incubar 37°C/24h



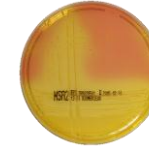
Agar chocolate,
N. meningitidis,
H. influenzae



Agar Sangre,
S. pneumoniae



McConkey,
enterobacterias



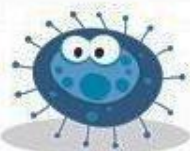
ASM,
Staphylococcus



AST,
Pseudomonas



SDA/Biggy
levaduras



Heridas

■ Objetivo

Diferenciar los microorganismos asociados a infecciones en heridas por medio de una correcta toma de muestra, medio de transporte y cultivo para el aislamiento e identificación de los mismos.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las heridas externas incluyen las asociadas con una lesión traumática o con úlceras por decúbito, picaduras o mordeduras de animales, quemaduras o cuerpos extraños en la piel o las mucosas. Las heridas internas y los abscesos pueden asociarse con apendicitis, colestitis, celulitis, infecciones dentales, osteomielitis u otras infecciones internas, muchos de estos procesos son intrahospitalarios, contraídos después de manipulaciones quirúrgicas o colocación de prótesis, otros derivan de la diseminación sanguínea a partir de sitios primarios de infección o puede existir la diseminación directa desde sitios adyacentes o por la rotura de una víscera (intestino grueso).

Uno de los indicadores fundamentales de la sepsis local es la acumulación de pus dentro de un absceso o que exuda desde una fístula o de una superficie mucocutánea. Pueden encontrarse diferentes grados de enrojecimiento, dolor y tumefacción.

Cuando el hospedero es inmunocompetente, microorganismos como *S. aureus* y *S. pyogenes* por factores de virulencia como su cápsula o producción de enzimas y toxinas, son capaces de vencer las defensas e inducir enfermedad clínica. En el caso de individuos con alguna alteración en la piel o con compromiso inmunológico, pueden ser afectados tanto por agentes virulentos como saprófitos.

En las patologías producidas por anaerobios cabe señalar la presencia de diferentes especies bacterianas, aerobias, anaerobias facultativa y anaerobias estrictas, por lo tanto las enfermedades que producen estos microorganismos son polimicrobianas.

Los **clostridios** son bacilos grandes, grampositivos, anaerobios, no encapsulados y móviles por medio de flagelos peritricos. Las esporas de *C. tetani* tienen mayor diámetro q las células vegetativas dándoles morfología de baqueta, mientras que las esporas de *C. botulinum* son subterminales, los que son medicamente importantes pueden cultivarse y aislarse en atmósfera que contenga 90% de nitrógeno y 10% de CO₂ en medios con carne picada y cocida y algún agente reductor como el tioglicolato. Algunos producen colonias grisáceas, difusas, traslúcidas e irregulares, otros las dan filamentosas y la mayoría producen β-hemólisis en agar sangre, son catalasa negativos.

Bacillus. *Bacillus anthracis*, el microorganismo que produce el carbunco, constituye el miembro más importante de este género. Es un microorganismo grande que se dispone en forma aislada o en parejas de bacilos en las muestras clínicas, o bien como cadenas largas en forma de serpentina, las esporas se observan con facilidad en los cultivos de 2 a 3 días.

Las infecciones por *B. anthracis* se caracterizan por la presencia de elevada concentración de microorganismos en las heridas, ganglios linfáticos y sangre. Las esporas no aparecen en las muestras clínicas, sino en cultivos incubados con concentraciones bajas de CO₂ y se visualizan aplicando tinciones como Verde Malaquita. Las colonias cultivadas en Agar Sangre de Carnero son de gran tamaño, carecen de pigmentación y presentan una superficie seca “cristal molido” y bordes irregulares con proyecciones a lo largo de la estría (morfología de “Cabeza de Medusa”). Las colonias son relativamente pegajosas y se adhieren al agar cuyo borde se parece a la clara de un huevo.

Bacteroides son bacilos gramnegativos con extremos redondeados, pleomórficos, muestran vacuolización y coloración bipolar. Las colonias son convexas, con bordes enteros, brillantes u opacas, de color blanco amarillento. No producen pigmento, son oxidasa negativo. Resistentes a las sales biliares al 20%, hidrolizan la esculina, glucosa positiva, catalasa variable e indol variable. *B. fragilis* y *B. thetalotaomicron* son las de mayor importancia clínica, siendo aislados de infecciones intraabdominales.

Prevotella son bacilos cortos gramnegativos, con una producción de pigmento negro variable, oxidasa negativos, indol variable, son inhibidos por la bilis al 20%, no hidrolizan esculina, catalasa negativa y glucosa positiva. Algunas especies producen infecciones genitales y orales, siendo resistentes a antibióticos betalactámicos.

Fusobacterium. Bacilos gramnegativos, delgados y según la especie pueden presentar flagelos peritricos o ser inmóviles. Las colonias son brillantes, con centro denso y elevado. No producen pigmento, son oxidasa negativo y son variable para las siguientes pruebas: indol, hidrólisis esculina, glucosa y lactosa. *Fusobacterium nucleatum* es la especie aislada con mayor frecuencia, en boca, vías respiratorias altas, sistema gastrointestinal y genitales. *F. mortiferum* y *F. varium* se recuperan de infecciones intraabdominales.

Recolección de muestra	Entidad clínica	Agente etiológico
<p>➔ La biopsia de tejido:</p> <p>Después de hacer una asepsia del sitio afectado, se deben obtener dos muestras de tejido profundo del sitio de la lesión, de 4-5mm, por incisión, raspado o con sacabocados. Una de ellas se deposita en solución de formalina para las coloraciones y estudios histopatológicos; la otra, en medio de transporte líquido para hacer los cultivos.</p>	<p>Ectima. Hay extensión a la dermis y producción de vasculitis. La lesión primaria se inicia como placas edematosas bien delimitadas con rápida evolución a eritema, aparece un foco hemorrágico central que al acumular sangre forma una ampolla, la cual por erosión a través de la dermis evoluciona a una úlcera costrosa, oscura, necrótica, de bordes elevados.</p>	<p>Forma primaria (picaduras de insectos): <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> Enfermedad sistémica: <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> Otros microorganismos asociados con estas lesiones: <i>Escherichia coli</i>, <i>Aeromonas hydrophyla</i>, <i>Morganella morganii</i>, <i>Vibrio vulnificus</i> y <i>Serratia marcescens</i>.</p>
	<p>Mionecrosis o gangrena gaseosa. Resulta de una infección anaerobia del músculo después de trauma o cirugía. Sus signos son sistémicos de parición precoz acompañados de dolor intenso, crepitación a la palpación de los tejidos, grandes ampollas, áreas necróticas y material serohemático.</p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>
	<p>Gangrena sinérgica o de Meleney. Úlcera necrótica de bordes eritematosos. Toxicidad mínima, dolor, al palpar puede o no encontrarse crepitación.</p>	<p><i>Streptococcus pyogenes</i> + <i>S. aureus</i> <i>Proteus spp</i> <i>Peptostreptococcus spp</i></p>
<p>➔ El raspado de una herida que supura:</p> <p>En estos casos, se debe limpiar la superficie de la lesión con solución salina estéril, luego quitar la costra y del fondo tomar el exudado con escobillón o en ausencia de exudado, una alternativa es raspar la superficie de la lesión con una hoja de bisturí, sembrar directamente el material así obtenido en los medios de cultivo y emplear la muestra de un segundo raspado para hacer un extendido que se colorea con Gram.</p>	<p>Foliculitis. Lesión con apariencia de pústula rodeada por un halo eritematoso.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>: cuello, tronco, glúteos y extremidades. <i>Pseudomona aeruginosa</i>: principalmente en tronco y extremidades. <i>Klebsiella spp</i>, <i>Escherichia spp</i>, <i>Serratia spp</i> (forma pustular); <i>Proteus spp</i> (nodular, quística): habitualmente en cara.</p>
	<p>Hidradenitis supurativa. Inflamación supurativa de glándulas sudoríparas, se caracteriza por nódulos firmes y dolorosos recubiertos por piel eritematosa que se encuentran abiertos y drenan material purulento.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> asociado con: <i>Streptococcus milleri</i> Bacilos gram(-) entéricos.</p>
	<p>Forunculosis. Lesión extensa, nodular, sensible y eritematosa de origen folicular.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
	<p>Carbúnculo. Múltiples forúnculos unidos por trayectos fistulosos. A menudo se encuentran en cara, cuello, glúteos, sus síntomas son sistémicos.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>.</p>

<p>➤ El aspirado del líquido o pus loculado de la parte profunda de la herida:</p> <p>Aspiración de la ampolla o de una zona de fluctuación con aguja con previa limpieza de la piel superficial.</p> <p>En caso de no poder obtener el material con aguja se puede tomar una muestra de la superficie con hisopo, puede ser necesario separar los bordes de la herida con el pulgar y el índice de una mano. O realizar un pequeño corte con una hoja de bisturí en un absceso cerrado antes de introducir la punta del hisopo en la lesión.</p>	<p>Impétigo. Se conocen dos formas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Impétigo contagioso. Corresponde al 70% de los casos, se caracterizan sus lesiones por ser en inicio eritematosas en cuya superficie se forman vesículas pequeñas o pústulas confluentes con halo inflamatorio que van evolucionando a costras amarillentas, húmedas y gruesas. Su ubicación es en áreas expuestas cercanas a orificios (boca, nariz). ■ Impétigo ampolloso. Se caracteriza por ampollas de pared delgada sin eritema alrededor, de contenido turbio. Puede ser localizada o ampliamente distribuida. 	<p>Impétigo contagioso causado por <i>S. pyogenes</i> Impétigo ampolloso causado por <i>S. aureus</i>.</p>
	<p>Erisipela. Se caracteriza por eritema, edema y dolor asociados a fiebre y leucocitosis. Las lesiones son de bordes elevados y definidos. Genera compromiso linfático comúnmente afecta la cara y extremidades.</p>	<p><i>Streptococcus pyogenes</i> Ocasionalmente en recién nacidos: <i>Streptococcus agalactiae</i>.</p>
	<p>Celulitis. El área comprometida generalmente está en las extremidades inferiores o superiores, no es bien demarcada y en las formas más graves se pueden observar ampollas.</p>	<p><i>Vibrio vulnificus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> Por mordedura: <i>Pasteurella multocida</i>, <i>Staphylococcus intermedius</i>.</p>
	<p>Ántrax cutáneo. Resulta de la inoculación de las esporas. La localización más común es en la cara, cuello y brazos. Después de 1-7 días se desarrolla una pápula que evoluciona a ampolla de líquido claro con abundantes bacilos Gram (+), la lesión puede estar rodeada de vesículas y tumefacción, que al romperse forman una úlcera cubierta con una escara negruzca. Hay presencia de fiebre, cefalea y compromiso del estado general. Solo un bajo porcentaje de los casos progresa a sepsis.</p>	<p><i>Bacillus anthracis</i>.</p>

	<p>Mordeduras. Por lo común son polimicrobianas incluyendo especies anaerobias facultativas y estrictas. Como consecuencia de la mordedura se puede observar celulitis seguida en frecuencia por abscesos, linfagitis y adenopatía regional.</p>	<p><i>Especie más frecuentemente aislada: Pasteurella multocida, Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Corynebacterium spp, Fusobacterium nucleatum, Bacteroides tectum, Prevotella bivia</i></p>
<p>➤ Prótesis articulares</p> <p>Aspiración preoperatoria de la articulación o de tejido obtenido al momento de la cirugía.</p>	<p>Los signos y síntomas varían desde un síndrome de artritis séptica agudo hasta un dolor crónico sin síntomas constitucionales.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> o estreptococo β-hemolítico son la causa del síndrome de artritis infecciosa aguda. Estafilococos coagulasa(-) son causa de síndrome crónico.</p>

Heridas. Agentes etiológicos y toma de muestra.

Diagnóstico

Se debe realizar la tinción de Gram a todas las muestras. Si se recibe una biopsia, el examen histológico debe incluir las tinciones para bacterias y hongos y el examen de una tinción de hematoxilina-eosina para la búsqueda de inclusiones virales.

Utilizar medios selectivos y no selectivos enriquecidos para aislar las especies bacterianas eugónicas y con requerimientos nutricionales especiales, si el material es aspirado o tejido es recomendado un cultivo para bacterias anaerobias.

Infecciones Oculares

Las infecciones externas suelen involucrar las estructuras superficiales, conjuntiva y córnea, a menos que ocurra una lesión penetrante que introduzca microorganismos al glóbulo ocular.

Conjuntivitis

Se caracteriza por ardor, edema, hiperemia e hipertrofia folicular conjuntival, y secreciones mucopurulentas en cantidad leve a moderada. Sus agentes etiológicos son: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*.

Conjuntivitis gonocócica. Usualmente se presenta en los primeros días de vida de un recién nacido, caracterizada por un gran edema palpebral, quemosis e hiperemia conjuntivales y abundante secreción purulenta. Puede complicarse con un absceso corneal. Es causada por *Neisseria gonorrhoeae*.

Conjuntivitis por Chlamydia. Causada por *Chlamydia trachomatis*, es una infección de transmisión sexual que causa conjuntivitis crónica, caracterizada por hiperemia conjuntival, hipertrofia folicular, conjuntivalización corneal (pannus) y secreciones mucosas en cantidad leve a moderada.

Queratitis

Se trata de una infección aguda de la córnea que causa dolor ocular, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, edema palpebral, hiperemia intensa, secreciones mucopurulentas en cantidad variable, opacidad corneal usualmente blanquecina cuyo tamaño y posición varían. Sus agentes etiológicos son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella lacunata*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*

Endoftalmitis

Puede ser postrauma, posquirúrgica o por diseminación endógena de una infección. Se caracteriza por dolor ocular progresivo, pérdida de la visión, edema palpebral, hiperemia, hipopion y opacidad del humor vítreo. Los microorganismos causantes son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Propionibacterium acnés*, *Candida albicans*.

Diagnóstico

En las infecciones externas el diagnóstico bacteriológico se realiza mediante tinción de Gram y el cultivo del material superficial, o cultivo tisular en el caso de virus. En casos internos como la endoftalmitis aguda, requiere retiro del humo acuoso infectado. El estudio oftalmológico mediante lámparas de hendidura y la retinoscopia son de ayuda para sugerir el agente etiológico con base en la morfología de las lesiones observadas.

Infecciones del oído

Otitis externa.

Infección del conducto auditivo externo, es una de las causas de otalgia, las manifestaciones clínicas más frecuentes son: dolor, hipoacusia, otorrea y edema con compromiso periauricular. Agentes etiológicos: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium spp* y anaerobios como *Propionibacterium acnés*. Puede ocurrir invasión por *Pseudomonas aeruginosa*.

Otitis media aguda

Se caracteriza por la presencia de líquido en el oído medio, eritema y abombamiento de la membrana timpánica acompañados de otalgia, fiebre e hipoacusia. Los patógenos más frecuentes son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*.

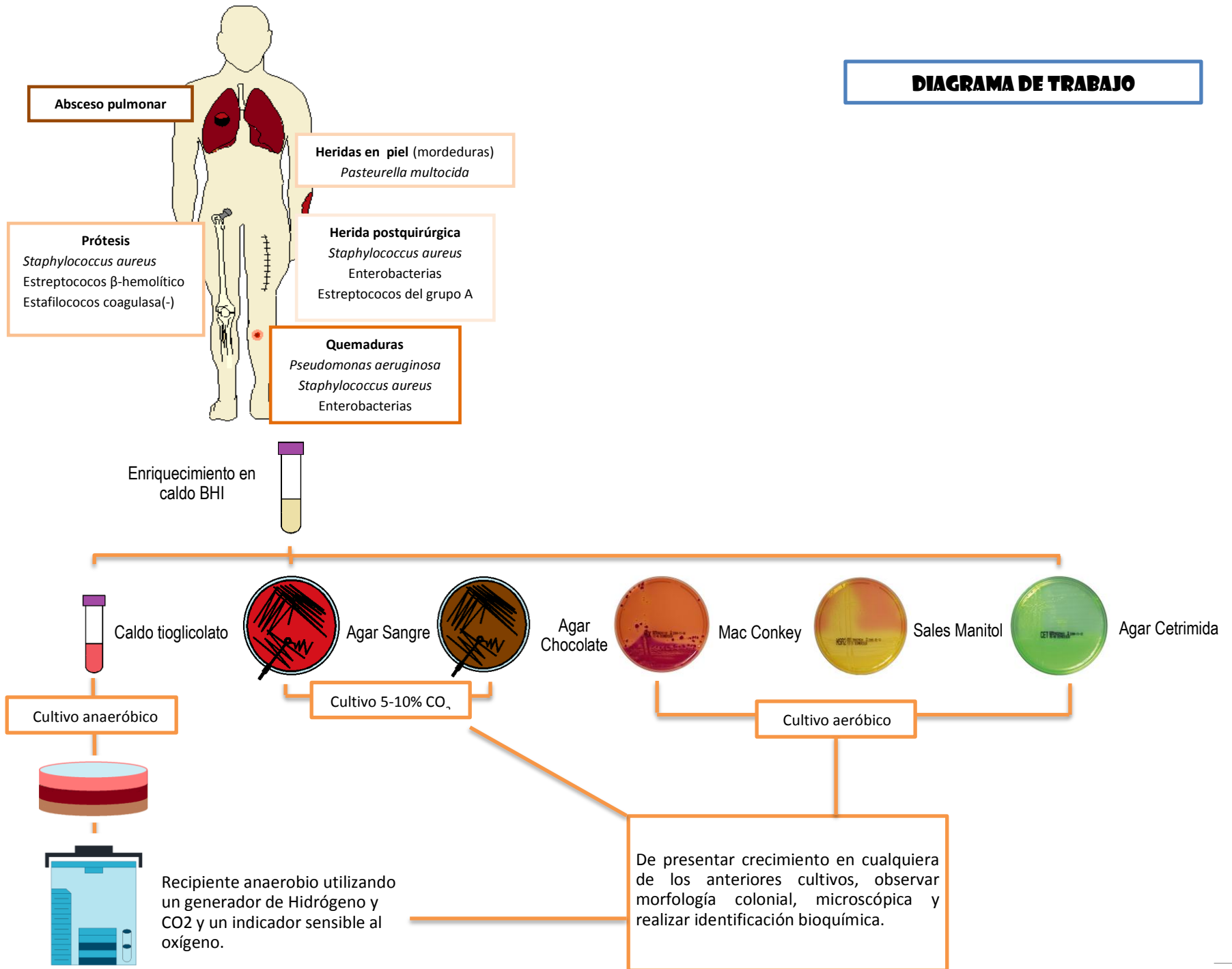
Otomastoiditis aguda

Inflación periauricular, el compromiso puede ir de un eritema o absceso en la región mastoidea o en los músculos digástrico y esternocleidomastoideo (absceso de Bezold) hasta trombosis de seno cavernoso. Sus agentes etiológicos son *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. De los casos crónicos se pueden aislar *S. aureus* y bacilos gramnegativos entéricos.

Diagnóstico

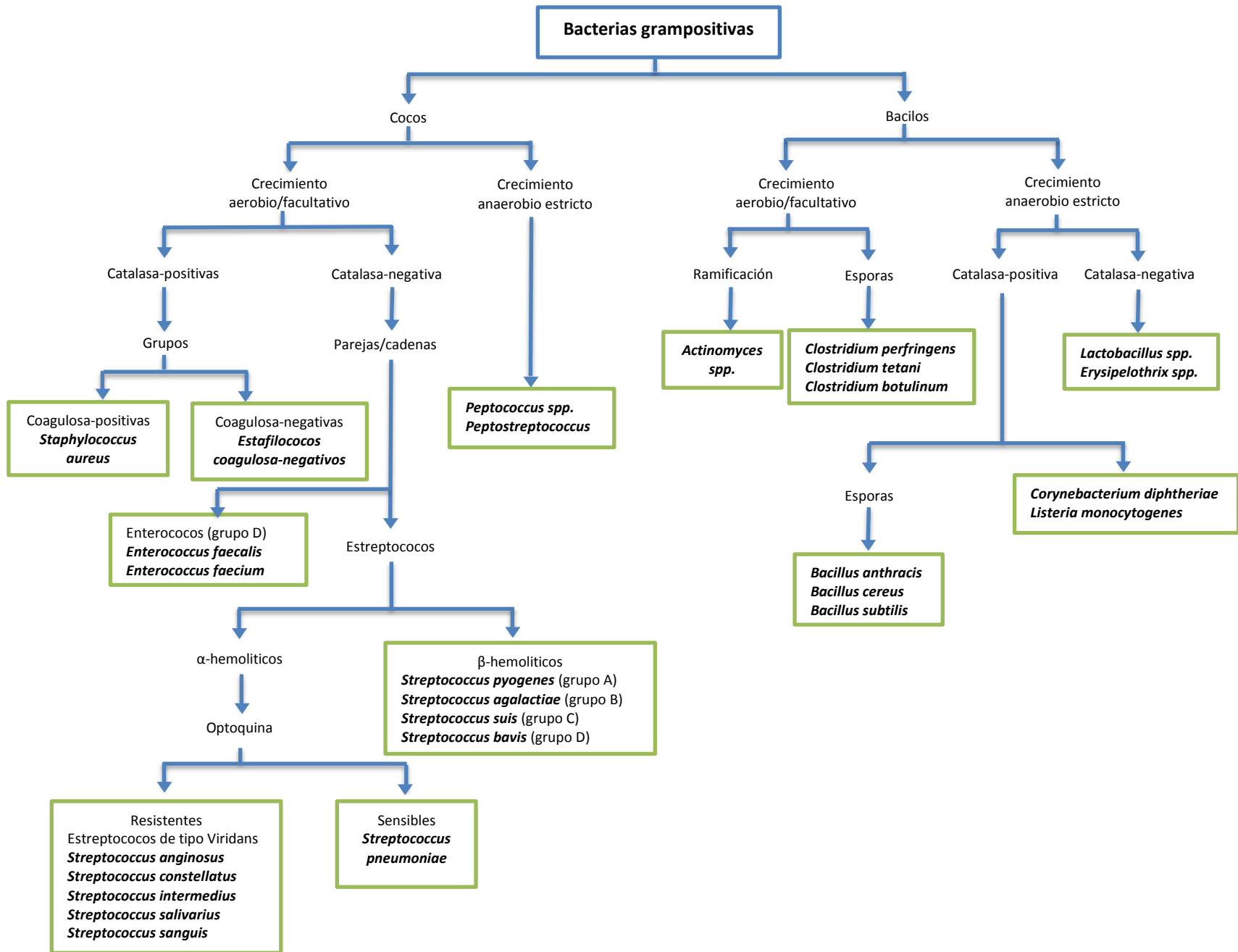
Cuando se sospecha de otitis media el método diagnóstico es la tinción de Gram y el cultivo de los aspirados extraídos con una aguja estéril a través de la membrana timpánica, después de descontaminar el conducto auditivo. La causa de otitis externa puede determinarse por cultivo de material obtenido del conducto auditivo afectado.

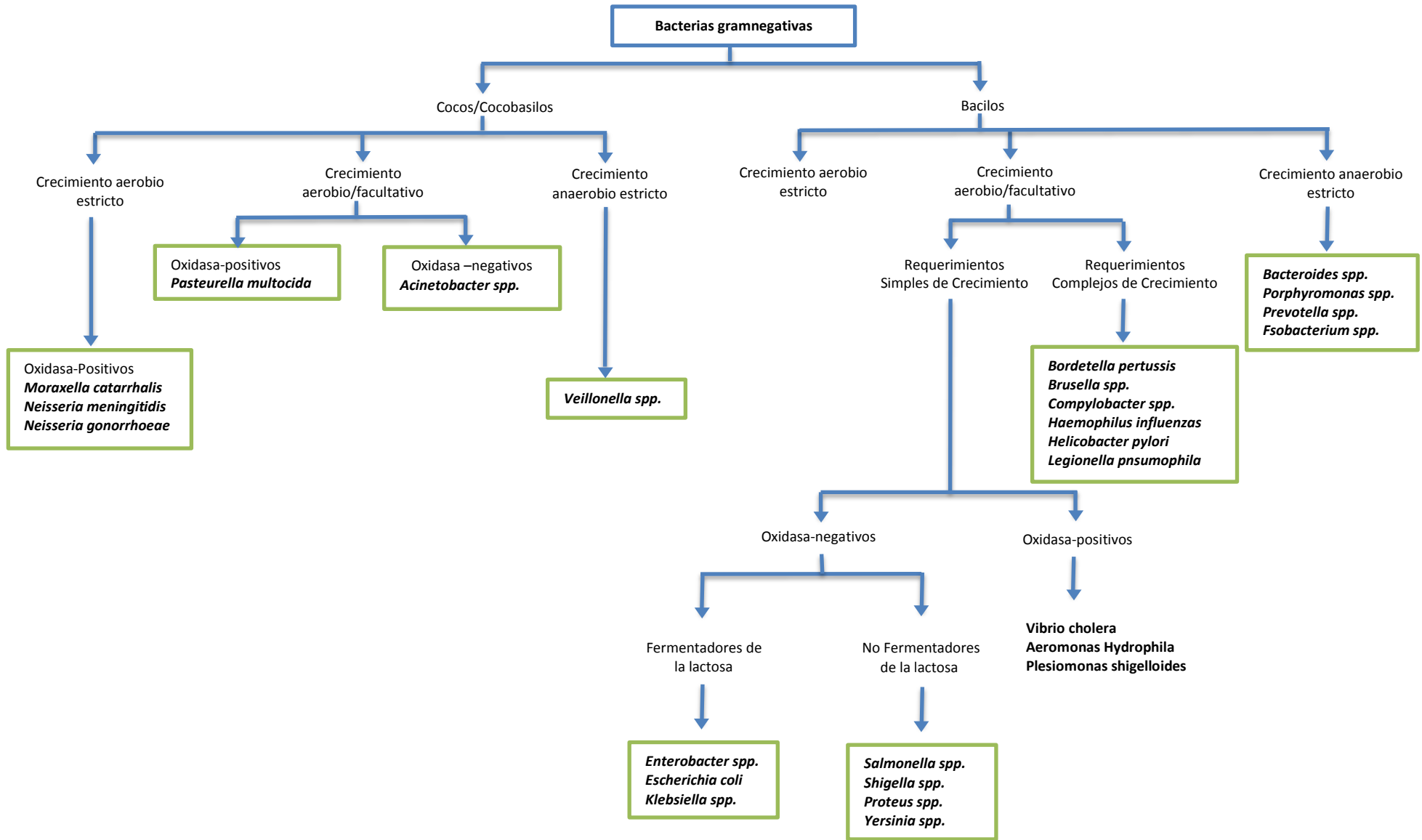
DIAGRAMA DE TRABAJO





Cuadros de Identificación





■ REFERENCIAS

1. Lansing M. Prescott, J.P. Harley, D.A. Klein. "Microbiología". 5ª edición. Editorial McGraw Hill. (2002).
2. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. "Microbiología Médica". 5a edición. Elsevier. España (2007).
3. Elmer W. Koneman. "Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color". 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina (2008).
4. Kenneth J. Ryan y C. George Ray. "SHERRIS. Microbiología Médica". 5ª edición. Editorial McGrawHill. México (2011).
5. J. Tay Zavala. "Microbiología y Parasitología". 3ª edición. Méndez Editores. México (2003).
6. F. Cobo Martínez. "Enfermedades Infecciosas. Recogida de muestras. Aspectos novedosos en Bacteriología". 6ª edición. Editorial Formación Alcalá. España (2006).
7. Paul G. Engelkirk, Janet Duben-Engelkirk. "Burton's. Microbiology for the health sciences". 9ª edición. Lippincott Williams & Wilkins. (2010).
8. Baley & Scott. "Diagnóstico Microbiológico". 12ª edición. Editorial Panamericana. USA (2009).
9. Walter R. Wilson. "Diagnóstico y Tratamiento de enfermedades Infecciosas". Editorial Manual Moderno. México (2002).
10. Omar J. Palmieri. "Enfermedades Infecciosas". Editorial McGraw Hill. Chile (2001).
11. J. Keith Struthers, Roger P. Westran. "Bacteriología Clínica". Masson. Barcelona (2005).
12. Francisco Javier Díaz C.; et al. "Microbiología de las Infecciones Humanas". Editorial. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia (2007).
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10ª edición. Volumen I. México (2011).
14. R. Díaz, C. Gamazo. "Manual práctico de Microbiología". 2ª edición. Editorial Masson. México (2003).
15. J. B. Henry. "Laboratorio en el Diagnóstico Clínico". 20ª edición. Editorial MARBÁN. España (2010).
16. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización.

17. Norma Mexicana NMX-AA-42-1987. Calidad del agua Determinación del Número más Probable (NMP) de Coliformes Totales, Coliformes Fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993. Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM-059SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998).
21. <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>
22. MERCK. Microbiological Analysis of Water. Microbiological Testing of Water usin Radycult® Coliforms and Enterococci.
23. BD Sistemas BBL Crystal de Identificación. Equipo para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes.
24. Alfonso R. Gennaro. "Remington Farmacia". 20ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina (2003).
25. Murali Dharan. Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos. Editorial Reverté, S. A. España (2002).
26. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Normas y Guía Técnica. Parte II, Cultivo. Organización Mundial de la Salud (2008).



Análisis de Agua

Objetivo

Conocer los métodos utilizados para el análisis microbiológico de agua, así como los medios empleados para la identificación bacteriana, basado en las normas mexicanas establecidas.



- **Agua para uso y consumo humano:**


Aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.

- La vigilancia de la calidad del agua es fundamental para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades, como las de tipo gastrointestinal y las producidas por contaminantes tóxicos.

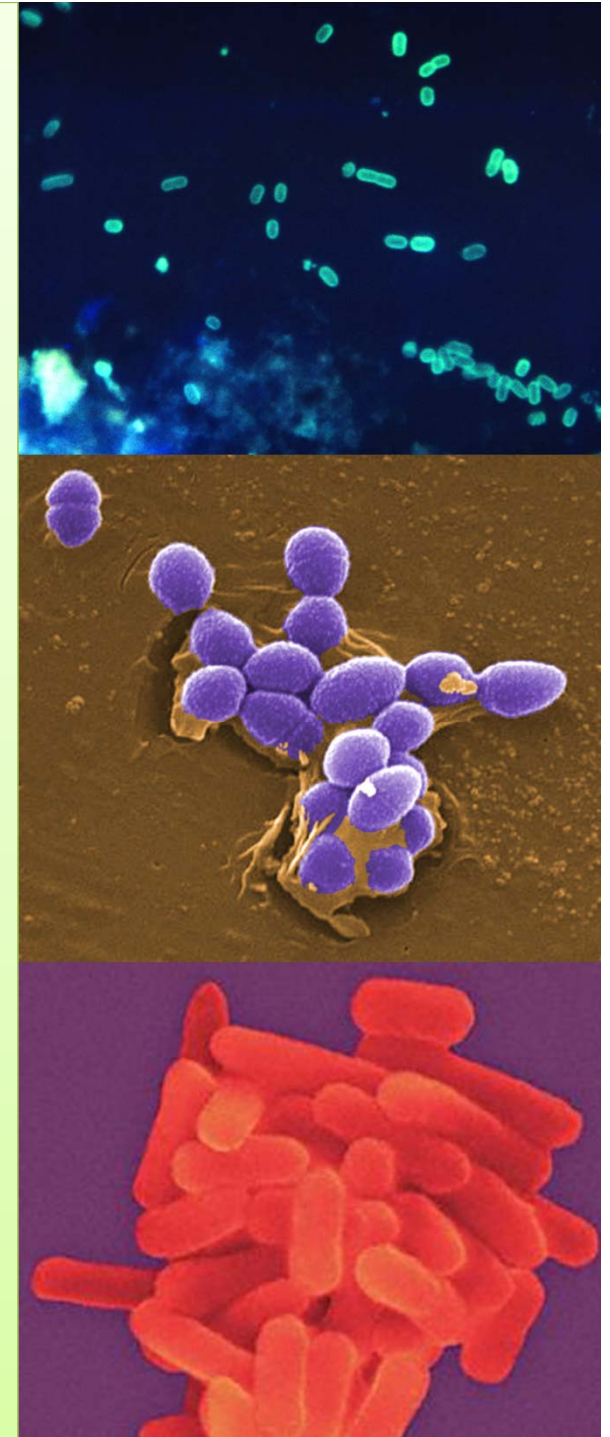


Se han empleado microorganismos indicadores como índice de contaminación posible por agentes patógenos humanos:

- **Coliformes:** Se definen como bacterias anaerobias facultativas, gram negativas, no esporulantes, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 horas a 35-37°C. El grupo de coliformes incluye *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*.
- **Coliformes fecales o termotolerantes:** presentan las mismas características y propiedades fermentativas a 44°C.
- Los enterococos fecales, han sido utilizados cada vez más como indicadores de contaminación fecal en aguas salobres y marinas. En aguas saladas estas bacterias mueren a una velocidad más lenta que los coliformes fecales, siendo indicadores más seguros de una posible contaminación reciente.

CARACTERÍSTICA	LIMITE PERMISIBLE
Coliformes Totales	Ausencia o no detectables
 E. coli o coliformes fecales (organismos termotolerantes)	Ausencia o no detectables

NOM-127-SSA1-1994



Toma de muestra



Para el análisis microbiológico de agua se necesitan frascos de vidrio, frascos estériles o bolsas estériles con cierre hermético y capacidad de 125 o 250 mL, los cuales contengan 0.1mL de solución de Tiosulfato de Sodio al 3% por cada 120 mL de capacidad de los mismos.

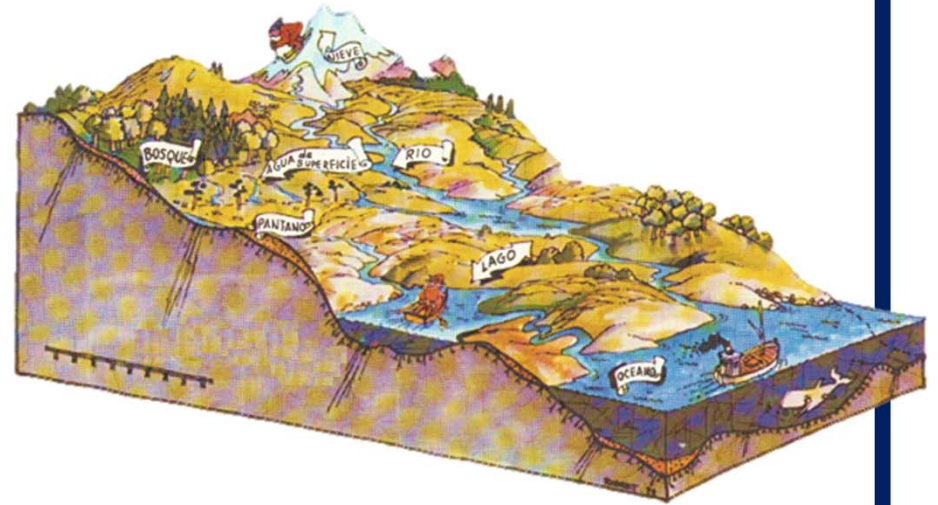
GRIFO O VALVULA

- Limpiar el orificio de salida con gasa estéril o torunda de algodón impregnada con solución de hipoclorito de sodio (100mg/L). Si el material y las condiciones del punto lo permiten se podrá calentar a flama directa y posteriormente limpiarse con alcohol.
- Dejar correr el agua aproximadamente 3 min. antes de tomar la muestra.
- Dejar el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (10% del volumen del frasco).



CAPTACIÓN DE UN CUERPO DE AGUA SUPERFICIAL, TANQUE O POZO.

- Lavarse manos y antebrazos y colocarse guantes y cubreboca.
- Sumergir el frasco con el cuello hacia abajo (15 a 30 cm de profundidad), destapar y girar el frasco ligeramente permitiendo el llenado.



Cuando no es posible tomar la muestra con la extensión del brazo:



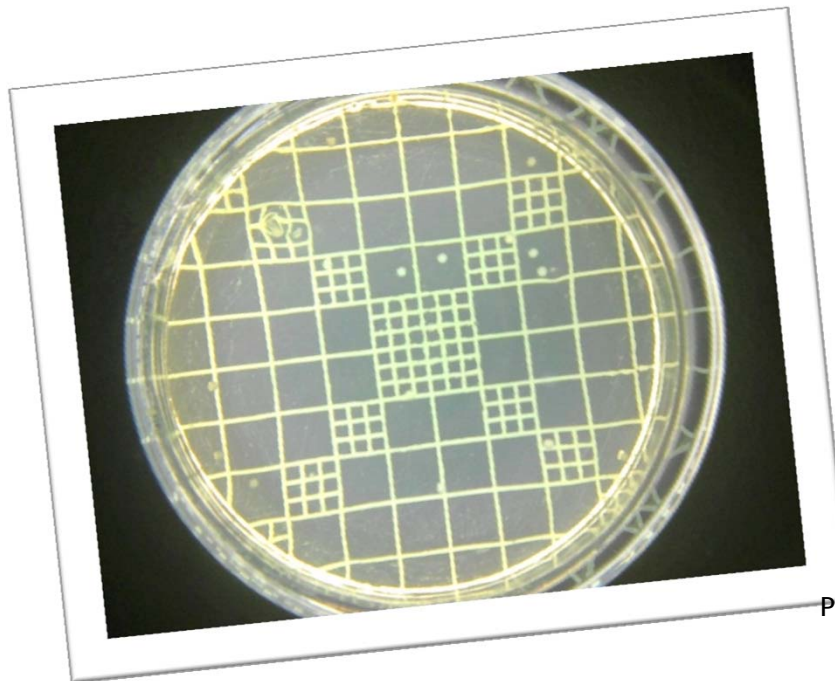
- Debe atarse el frasco con un cordel limpio o usar un equipo muestreador.
- Quitar el tapón.
- Tomar la muestra, bajando el frasco hasta una profundidad de 15 a 30 cm, evitando que el frasco toque las paredes del contenedor.

El uso de cultivos tradicionales para el monitoreo microbiológico de agua incluye, el método de vaciado en placa, filtración por membrana y prueba del número mas probable (NMP).

RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS AEROBIOS

Consiste en determinar el numero de UFC que se desarrollan al sembrar una cantidad medida o pesada de muestra en placas de agar.

Refleja la calidad sanitaria de las muestras analizadas, aun que tiene un valor limitado como indicador, ya que un recuento bajo no asegura ausencia de patógenos y un recuento alto no significa presencia de los mismos.



Placa de Agar Soya Trypticaseina
Incubación 35°C/48 hr

Determinación del Número más Probable

- ✘ Se basa en el hecho de que, a mayor número de bacterias mayor será la dilución necesaria para reducir la densidad hasta el punto en el cual no se desarrolle ninguna bacteria en los tubos de una serie de diluciones.
- ✘ El método para detección de coliformes comprende las pruebas presuntivas, de confirmación y finales.
- ✘ La fase presuntiva se realiza inoculando varios tubos con tres diluciones diferentes para obtener una estimación del número más probable de coliformes en el agua.
- ✘ El proceso total incluyendo las pruebas de confirmación y finales, requiere al menos 4 días.



Readycult

El medio Readycult es un caldo enriquecido selectivo para la detección simultánea de Coliformes totales y *E. coli*, utilizado en el análisis de agua.

La alta calidad nutricional de las peptonas y el buffer de fosfatos incorporado garantiza un rápido crecimiento de coliformes, mientras que el laurilsulfato inhibe otros microorganismos presentes en la muestra en especial grampositivos.

Al añadir el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) el cual es hidrolizado por coliformes y el 4-metilumbeliferil- β -glucurónido (MUG) específico para *E. coli* hace que su detección simultánea sea posible. La presencia de coliformes totales es indicado por un color azul-verde presente en el caldo y *E. coli* por un color azul, fluorescente bajo luz UV.

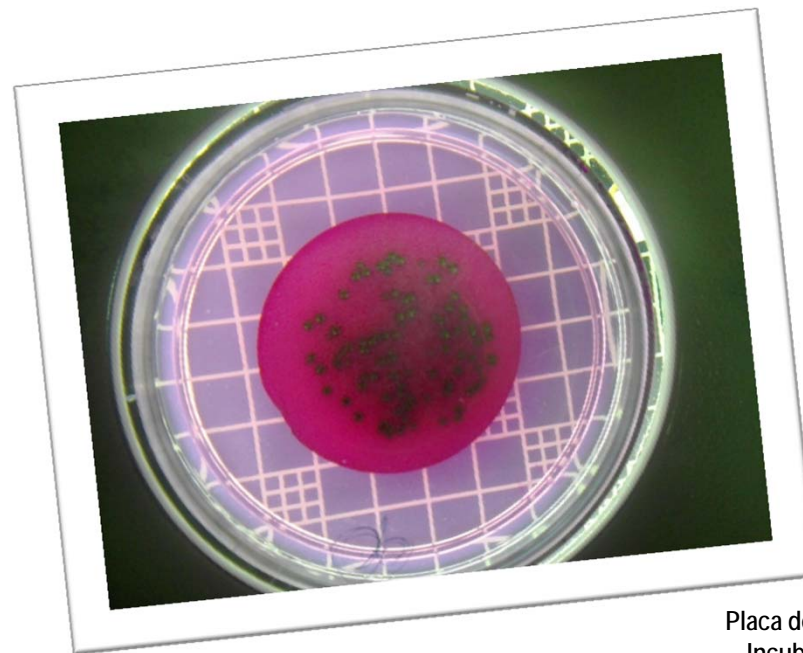
	Cambio de coloración azul-verde	Fluorescencia	Reacción de Indol
Coliformes Totales	+		
<i>E. coli</i>	+	+	+
Negativo	amarillo		



Filtración por membrana

Los filtros de membrana se han utilizado ampliamente con agua que no contiene niveles elevados de organismos de fondo, sedimento o metales pesados.

En este método se pasa la muestra de agua a través de un filtro de membrana (0.45μ). El filtro con las bacterias atrapadas se transfiere a la superficie de un medio sólido o a un soporte absorbente, conteniendo el medio líquido deseado. El uso del medio apropiado permite la rápida detección de coliformes totales, coliformes o estreptococos fecales, por la presencia de sus colonias características. Las muestras pueden colocarse en un medio de recuperación selectivo o incubarse, antes de cultivarlas en las condiciones selectivas finales.



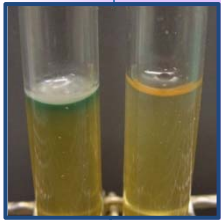
E. coli
Placa de Agar mEndoLES
Incubación 35°C/24hr

Muestra de agua
100mL

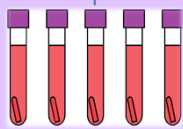


NMP

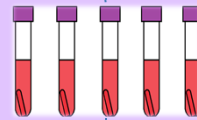
Semrar en Caldo Nutritivo



De presentar crecimiento sembrar en ACET



Dilución 10⁻¹



Dilución 10⁻²

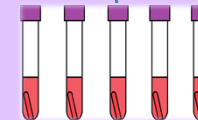
24hr/35°C

Negativo

CBVB para coliformes
35°C/48 horas.



Positivo
Semrar en
CBVB



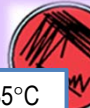
Dilución 10⁻³

CBVB para coliformes fecales
(termoestables)
44°C/48 horas.



Semrar en agar
MacConkey
Agar EMB
Medio mEndo LES

24hr/35°C



Identificación de *E. coli*
mediante IMVIC



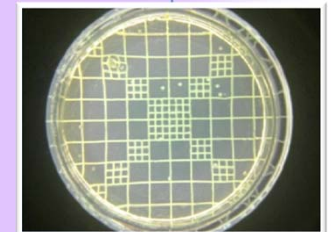
Recuento de Mesófilos aerobios

Colocar 1mL de la muestra de agua en cajas Petri

Agregar de 15 a 20mL de AST

Incubar de 30-35°C

Realizar el conteo de UFC/mL



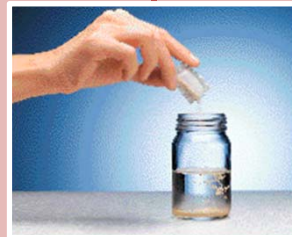
EMB= Eosina Azul de Metileno.
CBVB= Caldo Bilis Verde Brillante
AST= Agar Soya Trypticaseína

Readycult

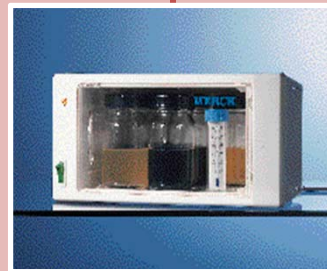


Agregar 50-100 mL de la muestra de agua en un recipiente estéril.

Añadir el contenido (X-gal y MUG) a la muestra de agua.
Cerrar el recipiente



Agitar hasta disolver completamente los gránulos.



Incubar de 35-37°C/18-24h

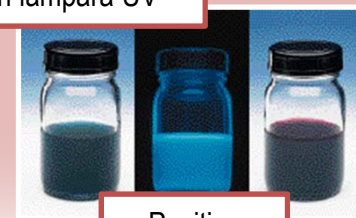


Positivo

Negativo

Observar resultados

Con lámpara UV



Positivo