



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

U. N. A. M. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN Departamento de Exámenes Profesionales

"MANUAL DE BACTERIOLOGIA DIAGNOSTICA".

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA : GUADALUPE HERNANDEZ TORRES

ASESORES: Q.F.I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA Q.F.B. MA. GUADALUPE AVILES ROBLES

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

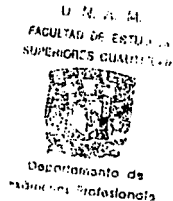
PAGINACIÓN

DISCONTINUA



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

_____ "Manual de Bacteriología Diagnóstica" _____

que presenta la pasante: Guadalupe Hernández Torres

con número de cuenta: 9158571-8 para obtener el título de : _____

_____ Química Farmacéutica Bióloga _____

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Abril de 2002

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	_____
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osneya</u>	<u>Andrea Becerril Osneya</u>
SECRETARIO	<u>M.V.Z. Mercedes Salgado Moreno</u>	_____
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	_____
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.P.P. Amparo Londoño Orozco</u>	<u>Amparo Londoño Orozco</u>

**LO QUE YO LOGRE EN LA VIDA ES
SOLO UNA PEQUEÑA GOTA EN EL
OCÉANO. PERO PARA MI ES LA
PLENITUD. LA VIDA PUEDE SER
COMPRENDIDA MIRANDO AL
PASADO Y, SIN EMBARGO, DEBE
SER VIVIDA CAMINANDO HACIA
ADELANTE.**

ANÓNIMO.

JURAMENTO PROFESIONAL DEL FARMACÉUTICO.

- Juro dedicar mi vida profesional al servicio de la humanidad por medio de la profesión farmacéutica.
- Tendré en cuenta el bienestar de la humanidad y el alivio de sus sufrimientos por encima de cualquier otra cosa.
- Usaré mis conocimientos y mi habilidad como mejor pueda para servir al público y a los demás profesionales de la salud.
- Haré todo lo que pueda para mantenerme al día con respecto a las novedades y progresos de mi profesión, y para mantener la competencia profesional en mi profesión de farmacéutico.
- Cumpliré las leyes que rigen la práctica de la farmacia y trataré de que otros las cumplan.
- Mantendré las normas más elevadas de la conducta moral y ética.

Todo esto lo juro por mi propia voluntad y con pleno conocimiento de la confianza y responsabilidad que el público ha depositado en mí.

Juramento del Farmacéutico Norteamericano
Remington Farmacia

AGRADECIMIENTOS

A Dios : Gracias Señor por darme la vida, Por los padres y hermanos que me diste por el Don de la constancia y por ese ángel que supo llevarme por el camino correcto Mi madre pero sobre todo te doy gracias Por el hijo tan maravilloso que me mandaste.

A ti mamá que fuiste madre y padre cuando lo necesitamos y que sólo tu sabías de donde sacabas fuerzas para sacarnos adelante.

A mi querida Facultad de Estudios Superiores por ser parte de mi vida, donde pasé grandes momentos, pues me acogiste como mi segunda casa, porque dentro de tus aulas y sobre de tus jardines y canchas encontré dos cosas importantes para la vida: Mi superación profesional y mis amigos.

A mi esposo por que sin su ayuda nohubiera logrado este anhelo. Por todo el apoyo que siempre me has dado.

A la Máxima Casa de Estudios. "Universidad Nacional Autónoma de México" por abrirme sus. Puertas y Darme la oportunidad de ser Universitaria. "Por mi raza Hablará el Espíritu"

A la familia Estrada Hernández que fueron pieza muy importante en este juego y que me dieron las herramientas que requería para lograrlo.

A mis sinodales por dedicar su valioso tiempo en la revisión y mejoramiento de esta tesis.

A mis asesoras: Q.F.I. Andrea Becerril O. y Q.F.B. Ma. Guadalupe Avilés R. Por su tiempo, enseñanza y paciencia.

A Jorge Díaz Becerril por su ayuda para la terminación de este trabajo.

DEDICATORIAS.

A mi gran orgullo, Mi mamá, por tantos sacrificios para que yo saliera adelante, por haber depositado en mí confianza, tu fuiste siempre quien inyectó energía en mí y tu sola imagen me impulsaba a seguir adelante. Por esas ocasiones que te desvelaste a mi lado dándome ánimos para no claudicar. Gracias a ti me he convertido en lo que ahora soy, te dedico con todo mi amor este tu fruto. Tu muchachita.

A mi compañero inseparable durante toda mi vida universitaria que en todo momento estuvo conmigo y que nunca me dejó sola para que la adversidad me venciera y que siempre y en todo momento me apoyó., Mi esposo Israel gracias por compartir tu vida conmigo . He madurado a tu lado y has ido soportando con paciencia mis errores. Te Amo.

A mi hermano Rubén por que supo forjar en mí deseos de superarme y del cual aprendí que el talento se nutre en la soledad, el carácter se forma en los pasajes difíciles del trayecto de la vida. Con cariño.

A la memoria de Mi Padre , porque aún cuando ya no estabas tu esencia me acompañaba y porque sé que donde tu estés estarás orgulloso de tu niña. Con amor.

A mi pequeño gran tesoro: mi hijo Daniel por haber llegado a iluminar mi vida, por llenarme de esperanzas e ilusiones y por ser el principal motivo para superarme. Te lo dedico en especial a ti y te lo pongo como un reto a vencer y que estoy segura que lo superarás y con ello nos llenarás de orgullo. Con todo mi amor para ti Mi niño.

A mi hermano Abel Por transmitirme seguridad y deseos de triunfar, siempre tienes una frase oportuna, una sonrisa de aliento y un pensamiento edificante. Con cariño.

A mi hermana Soledad por haberme permitido ser parte de tu familia y por ese gran apoyo que me brindaste por que sin tu ayuda y consejos no lo hubiera logrado, este triunfo no solo es mío tus sabios consejos me sacaron adelante. Te quiero.

A mi hermano Serapio porque tu llenaste ese lugar que estando tan pequeña se quedó vacío, tu fuiste y eres mi gran apoyo y siempre has estado pendiente de mis necesidades, problemas, alegrías, triunfos y fracasos y en cada uno de ellos has tenido la palabra adecuada para confortarme o hacerme razonar, gran parte de lo que soy de lo debo a ti, gracias hermano por ser tu. Te quiero.

A mi hermano Eduardo, tu siempre me has transmitido confianza y has creído en mí, gracias por preocuparte por mí y gracias por toda esa ternura, alegría y optimismo que me transmites. Te quiero.

A mi cuñada Mary, gracias por ser esa persona tan generosa, noble y siempre dispuesta a escuchar y dar apoyo. Con cariño

A mi hermana Martha por compartir conmigo tus vivencias y por transmitirme confianza, alegría y ganas de vivir, siempre has tenido un consejo y una palabra de aliento cuando más lo necesitaba. Con cariño

A mi hermana Alicia, siempre fuiste mi ejemplo a seguir tu tenacidad y deseos de superación yo los tenía siempre presentes y me impulsaban a sacar fuerzas en los momentos más difíciles de mi carrera. Gracias por compartir conmigo tus triunfos, alegrías y fracasos Con cariño.

A mi hermano Juan manito tu sabes que juntos hemos recorrido un camino lleno de tristezas y sin sabores, que tu con tu optimismo y forma tan jovial de ver la vida lo hacías más bello y llevadero; de ti aprendí que el amor a la familia, la constancia y la fuerza de voluntad son necesarias para triunfar en la vida y lograr la plenitud. Con cariño.

A mi cuñada Araceli por todos esos consejos que me has dado. Gracias por apoyarme y por ese cariño que siempre he recibido de ti. Con cariño

A mi cuñado Carlos, porque sin tener obligación me abriste las puertas de tu casa y tu corazón y me diste la misma oportunidad que a tus hijos de ser alguien en la vida, gracias por valorarme frente a personas que quisieron pisotearme. Con cariño

A mis hermanos adoptivos: Maribel, Oscar y Gabriel por soportarme tantos años gracias por tantos momentos agradables y por esas sonrisas y travesuras que me hacían olvidarme de todo lo agobiante de mi carrera, y por considerarme un miembro más de su familia

A mis sobrinos: Lorena, Enrique, Manuel, Gris, Lizbeth, Toño, Chell, Christopher, J. Alberto, Lety, Brenda, Maribel, Oscar, Gabriel, Mauricio, Ana, Rubén G. H., Nancy, Mario, Noella, Liliana, Andrea, Juan Carlos, Laura A., Rubén H.C., Ricardo, Irián, C. Alberto, Jessica, Irving, Adrián, Christopher, Cinthia, Luis E., Catherine, Mireya, Edgar, Valeria, C. Rubén. Como una muestra de cariño de su tía.

A mis cuñadas: Araceli, Lucía, Juana, Isela y cuñados: Ricardo y Reinaldo porque de alguna u otra forma contribuyeron a esto, por ser parte de mi familia y por ayudar y querer a unas de las personas más importantes en mi vida. Con cariño.

A mi familia política Mis suegros: Sr. Román Becerril R. y Martha B. Galván y mi cuñada: Miriam, porque desde el momento en que formé parte de su familia me han brindado cariño y apoyo incondicional como aquel que se le da a un hijo, y por que han creído en mí y me ayudaron a sacar adelante este trabajo Con cariño.

A ti Tere Pichardo por esa persona tan genial que eres y por esa niña tan linda que llevas dentro, por brindarme tu amistad, por ayudarme y apoyarme siempre. Gracias por ser mi amiga.

A mis amigos: Claudia, Cris y Edgar, (Rodolfo), a mis tres mosqueteros por tantas ocasiones tan accidentadas pero que estuvieron llenas de aventuras y alegrías. Gracias por esa amistad leal, sincera, desinteresada; porque aún en la adversidad nuestra amistad perdura y basta con saber que responderán cuando sea necesario, con un acto de afecto y de comprensión. Gracias por tantos momentos agradables y tantas locuras que hicimos y que nos hicieron menos pesada y más llevadera nuestra estancia en la Facultad, saben que cuentan conmigo. Los quiero.

A la 19^{ma} generación de Q.F.B. por los grandes momentos que disfrutamos en la FES-C.

A Q.F.B. Lupita Avilés por su amistad y ayuda incondicional

A mis amigos de toda la carrera: Susana, Francisco, Rogelio M. José A., Marcela, Enrique, Angeles, Araceli, Israel M., Marco A. L., por los momentos tan agradables que compartimos. Con afecto.

A los laboratoristas Sr. Martín y Sra. Irene por brindarme su amistad y apoyo gracias. Doñita gracias por esos consejos, por escucharme y orientarme en tantas cosas.

A la profesora Q.F.I. Andrea Becerril, que siempre me apoyó, gracias por compartir una pequeña parte de su sapiencia y brindarme su amistad.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
Indice de tablas.....	I
Indice de figuras.....	II
Indice de pruebas especiales.....	III
Indice de anexos.....	IV
Tabla de abreviaturas.....	V
Resumen.....	VIII
Objetivos.....	X
Hipótesis.....	XI
Introducción.....	1
Capítulo I. Características Generales de Bacterias	
❖ Definición de Bacteria.....	3
❖ Clasificación de Bacterias.....	3
➤ Por su forma.....	3
➤ Por sus necesidades de oxígeno.....	4
➤ Por sus capacidades metabólicas o fermentadoras.....	4
➤ Por la capacidad de producir esporas.....	4
➤ Por las características de su pared.....	4
➤ Por su movimiento.....	5
▪ Presencia de flagelos.....	5
▪ Por deslizamiento.....	5
❖ Morfología.....	6
➤ Microscópica.....	6
➤ Colonial.....	7
❖ Estructura.....	10
➤ Nucleoide.....	10
➤ Citoplasma.....	11
➤ Pared celular.....	12

Contenido	Página
▪ De Gram (+).....	12
o Peptidoglicano.....	12
o Acidos teicoicos.....	12
o Acidos lipoteicoicos.....	13
o Acidos teicurónicos.....	13
o Polisacáridos.....	13
o Proteínas.....	13
▪ De Gram (-).....	13
o Peptidoglicano.....	13
o Periplasma.....	14
o Membrana externa.....	14
o LPS (endotoxina).....	15
o Lipoproteínas.....	15
o Proteínas de membrana externa.....	15
▪ De Acido-alcohol resistentes.....	16
➤ Flagelos.....	17
➤ Glicocálix o cápsula.....	18
➤ Mesosomas.....	18
➤ Fimbrias.....	18
▪ Tipo I.....	19
▪ Tipo II.....	19
➤ Ribosomas.....	19
➤ Inclusiones citoplasmáticas.....	19
➤ Esporas.....	19
❖ Metabolismo bacteriano.....	20
➤ Hidratos de Carbono.....	20
➤ Asimilación de Nitrógeno y azufre.....	20

Contenido

➤ Síntesis de nucleótidos.....	21
➤ Síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados.....	21
➤ Síntesis de constituyentes lipídicos a partir del acetato.....	21
❖ Bibliografía.....	22

Capítulo II. Monitoreo Ambiental

❖ Introducción.....	23
❖ Objetivo de unidad.....	25
❖ Objetivos de operación.....	25
❖ Material.....	26
❖ Técnica.....	27
❖ Diagrama de trabajo.....	28
❖ Hoja de resultados.....	30
❖ Bibliografía.....	31

Capítulo III. Análisis Microbiológico de Agua

❖ Introducción.....	32
❖ Objetivo de Unidad.....	35
❖ Objetivos de Operación.....	35
❖ Material.....	36
❖ Técnica.....	37
❖ Diagrama de Trabajo.....	39
❖ Hoja de resultados.....	41
❖ Bibliografía.....	42

	Página
Contenido	
Capítulo IV. Control de Calidad de Medios de cultivo	
❖ Introducción.....	43
❖ Objetivo de Unidad.....	45
❖ Objetivos de Operación.....	45
❖ Material.....	46
❖ Técnica	48
❖ Diagrama de Trabajo.....	50
❖ Hoja de Resultados.....	51
❖ Bibliografía.....	55
Capítulo V. Coprocultivo	
❖ Introducción.....	56
❖ Toma de Muestra.....	58
❖ Objetivos de Unidad.....	59
❖ Objetivos de Operación.....	59
❖ Material.....	60
❖ Técnica.....	62
❖ Diagrama de Trabajo.....	63
❖ Hoja de Resultados.....	64
❖ Bibliografía.....	65
Capítulo VI. Diagnóstico de <i>Vibrio cholerae</i>	
❖ Introducción.....	66
❖ Toma de Muestra.....	67
❖ Objetivos de Unidad.....	68
❖ Objetivos de Operación.....	68
❖ Material.....	69
❖ Técnica.....	71
❖ Diagrama de Trabajo.....	73
❖ Hoja de Resultados.....	74

	Página
Contenido	
❖ Bibliografía.....	75
Capítulo VII. Urocultivo.	
❖ Introducción.....	76
❖ Toma de Muestra.....	78
❖ Objetivos de Unidad.....	81
❖ Objetivos de Operación.....	81
❖ Material.....	82
❖ Técnica.....	85
❖ Diluciones.....	85
❖ Cálculo de UFC.....	86
❖ Diagrama de Trabajo.....	87
❖ Hoja de Resultados.....	88
❖ Bibliografía.....	90
Capítulo VIII. Sistemas Microestandarizados API 20-E	
❖ Introducción.....	91
❖ Objetivo de Unidad.....	93
❖ Objetivos de Operación.....	93
❖ Material.....	94
❖ Técnica.....	95
❖ Ejemplo para obtener el código y buscar el microorganismo problema.....	97
❖ Diagrama de Trabajo.....	98
❖ Hoja de Resultados.....	99
❖ Bibliografía.....	100
Capítulo IX. Exudado Faríngeo	
❖ Introducción.....	101
❖ Toma de Muestra.....	103
❖ Objetivo de Unidad.....	105

	Página
Contenido	
❖ Objetivos de Operación.....	105
❖ Material.....	106
❖ Técnica.....	108
❖ Diagrama de Trabajo.....	112
❖ Hoja de Resultados.....	114
❖ Bibliografía.....	116
Capítulo X. Diagnóstico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
❖ Introducción.....	117
❖ Toma de Muestra.....	119
❖ Objetivos de Unidad.....	120
❖ Objetivos de Operación.....	120
❖ Material.....	121
❖ Diagrama de Trabajo.....	122
❖ Hoja de Resultados.....	123
❖ Bibliografía.....	124
Capítulo XI. Exudado Cérvico-Vaginal o Uretral	
❖ Introducción.....	125
❖ Toma de Muestra.....	127
❖ Objetivo de Unidad.....	129
❖ Objetivo de Operación.....	129
❖ Material.....	130
❖ Técnica.....	133
❖ Diagrama de Trabajo.....	136
❖ Hoja de Resultados.....	138
❖ Bibliografía.....	140

Contenido

	Página
Capítulo XII. Hemocultivo	
❖ Introducción.....	141
❖ Toma de Muestra.....	143
❖ Objetivo de Unidad.....	147
❖ Objetivos de Operación.....	147
❖ Material.....	148
❖ Diagrama de & Trabajo.....	150
❖ Hoja de Resultados.....	151
❖ Bibliografía.....	153
Capítulo XIII. Secreción de Heridas	
❖ Introducción.....	155
❖ Toma de Muestra.....	157
❖ Objetivo de Unidad.....	158
❖ Objetivos de Operación.....	158
❖ Material.....	159
❖ Diagrama de Trabajo.....	161
❖ Hoja de Resultados.....	162
❖ Bibliografía.....	163
Capítulo XIV. Discusión.....	164
Capítulo XV. Conclusiones.....	165

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla No. 1 Tabla de Identificación para <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i>	182
Tabla No. 2 Tabla de Identificación para <i>Streptococcus</i>	183
Tabla No. 3 Tabla de Identificación para <i>Corynebacterium</i> y <i>Listeria</i>	184
Tabla No. 4 Tabla de Identificación para <i>Clostridium</i>	185
Tabla No. 5 Tabla de Identificación para <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Brucella</i> y <i>Bordetella</i>	186
Tabla No. 6 Tabla de Identificación para <i>Pseudomonas</i>	187
Tabla No. 7 Tabla de Identificación para <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> <i>Plesiomonas</i> y <i>Chromobacterium</i>	188
Tabla No. 8 Tabla de Identificación para <i>Neisseria</i> y <i>Brahamella</i>	189
Tabla No. 9 Tabla de Identificación para <i>Mycobacterium</i>	190
Tabla No. 10 Tabla de Identificación para <i>Haemophilus</i>	191
Tabla No. 11 Tabla de Identificación para Enterobacterias.....	192

INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura No. 1 Técnicas de sembrado en placas de Agar.....	8
Figura No. 2 Morfología colonial.....	9
Figura No. 3 Toma de muestra de vías urinarias para urocultivo. Técnica limpia...	79
Figura No. 4 Toma de muestra de vías urinarias para urocultivo Aspiración Suprapúbica.....	80
Figura No. 5 Técnica para obtener material para cultivo de garganta.....	104
Figura No. 6 Técnica para obtener material endometrial para cultivo.....	128
Figura No. 7 Toma de muestra de sangre para hemocultivo. Con aguja y jeringa....	144
Figura No. 8 Toma de muestra de sangre para hemocultivo. Sistema cerrado.....	145
Figura No. 9 Sistema para hemocultivo.....	146

INDICE DE PRUEBAS ESPECIALES

Contenido	Página
Hemaglutinación.....	71
Hemólisis.....	71
Prueba de polimixina B.....	71
Prueba del hilo mucoso.....	72
Hidrólisis alcalina.....	122
Células pista.....	133
Prueba de tubo germinativo.....	133
Prueba de KOH.....	134
Preparación en fresco para la observación de <i>Trichomonas</i>	134
Prueba de CAMP (<i>Streptococcus grupo B</i>).....	135

INDICE DE ANEXOS

	Página
Contenido	
Anexo No. 1 Tinciones Bacteriológicas.....	167
Anexo No. 2 Clasificación de niveles de aire limpio en áreas.....	170
Anexo No. 3 Biotest RCS.....	171
Anexo No. 4 MAS-100	172
Anexo No. 5 Anvirocheck Rodac Plates y HY-LITE-2.....	173
Anexo No. 6 Ready Cult.....	174
Anexo No. 7 Número más probable de organismos.....	175
Anexo No. 8 Hoja de resultados esperados en Control de Calidad de Medios de Cultivo.....	176
Anexo No. 9 Tabla de lectura para API 20-E.....	178
Anexo No. 10 Diversos Frascos para Hemocultivo.....	179
Anexo No. 11 Filtración de membrana para <i>Pseudomonas</i>	181
Anexo No. 12 Ejemplo de crecimiento en control de calidad de medios	193
Anexo No. 13 Crecimiento colonial en algunos medios de cultivo.....	195
Anexo No. 14 Referencia de antibióticos para antibiograma.....	197
Anexo No. 15 Pruebas bioquímicas.....	201
Anexo No. 16 Estructura de la Pared Celular Bacteriana.....	205

TABLA DE ABREVIATURAS

<u>ABREVIATURA</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ABi	Agar Biggy
Ac	Acido
Acet	Agar Cetrimida
ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AEMB	Agar Eosina Azul de Metileno
Ag	Antígeno
AMc	Agar Mac Conkey
AMH	Agar Miuller-Hinton
AS	Agar Sangre
ASB	Agar Sulfito-Bismuto
ASM	Agar Sales manitol
ASS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
AST	Agar Soya tripticaseína
ATCBS	Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa
ATCC	Asociation Type Culture Colectin
AVB	Agar Verde Brillante
AXLD	Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BAB	Agar Base sangre

Continuación

CAMP	Fenómeno de CAMP (Christie, Atkins y Munich-Peterson)
CBVB	Caldo bilis verde-brillante
CHOS	Carbohidratos
CLRFCS	Caldo lactosado rojo de fenol concentración simple
CLRFDC	Caldo lactosado rojo de fenol doble concentración
CST	Caldo soya tripticaseína
G.R.	Glóbulos rojos
G(+)	Gram positivas
G(-)	Gram negativas
HCl	Acido clorhídrico
Inc	Incubar
IVU	Infección de vías urinarias
KIA	Hierro de Kigler
KOH	Hidróxido de potasio
Lac (+)	Lactosa positiva
Lac (-)	Lactosa negativa
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LOA	Lisina-ornitina-arginina
LPS	Lipopolisacárido
MIC	Concentración mínima inhibitoria

Continuación

μ	Micras
μ l	Microlitros
M.o.	Microorganismo
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NMP	Número más probable
NOM	Norma oficial mexicana
O/F	Oxido-fermentación
OMS	Organización mundial de la salud
RPM	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIM	Acido sulfhídrico-indol-motilidad
TSI	Triple azúcar-hierro
U.I.	Unidades internacionales
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

El bacteriólogo a diario se enfrenta con distintas muestras clínicas a partir de las cuales intentará aislar e identificar bacterias que probablemente por sus características de patogenia, así como por su cantidad, ponen en riesgo la vida del portador.

Las principales funciones del laboratorio de *Bacteriología diagnóstica* consisten en examinar y cultivar muestras de m.o., la identificación de especie exacta de aislamientos importantes y llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a antibióticos cuando está indicado. Estas tareas ayudan a los médicos en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con enfermedades infecciosas. Los datos bacteriológicos también son valiosos para controlar el curso de la antibiótico-terapia y proporcionar información epidemiológica para definir orígenes comunes de infecciones.

Cada vez en mayor medida, la práctica de la bacteriología y el grado hasta el cual se identifiquen los m.o., van a ser resultado de un equilibrio entre aquello que es efectivo para el costo y cuanta información necesita un médico para tratar adecuadamente a un paciente, los microbiólogos deben continuar produciendo resultados clínicamente útiles en el menor tiempo posible.

Las muestras que requieren la identificación definitiva de m.o., con el potencial de causar enfermedades infecciosas se procesan aún más. Se eligen uno o más medios de cultivo y cada uno se inocula con una pequeña parte de la muestra sospechosa de alojar microorganismos patógenos. Se hacen estrias en placas de agar para aislamiento de colonias, las placas y caldos se colocan en una incubadora con la temperatura y ambiente apropiados para maximizar los resultados, y a menudo pueden hacerse identificaciones microbianas presuntivas. Se hace un informe final si puede darse una respuesta definitiva, de no ser así, el informe debe demorarse mientras se efectúan subcultivos y pruebas adicionales para identificar al m.o., de forma definitiva.

El desarrollo adecuado de las técnicas de laboratorio es una parte fundamental para los estudiantes de las distintas áreas microbiológicas que realizan actividades de laboratorio.

Además una tarea importante para los profesores e investigadores en el ámbito docente es proveer a los alumnos de conocimientos de una manera fácil y rápida sobre los métodos y equipo de laboratorio, así como las diferentes formas de toma de muestra.

OBJETIVOS GENERALES

Proporcionar al estudiante de Bacteriología diagnóstica una introducción práctica a la identificación en el laboratorio de los agentes microbianos asociados con enfermedades infecciosas de tipo bacteriano.

Mostrar al estudiante los diversos enfoques empleados en el laboratorio de bacteriología para indicar a los médicos resultados oportunos y determinar un diagnóstico y tratamiento.

Que el alumno obtenga la información sobre cómo realizar un aislamiento bacteriano en general, al igual señalar las bases prácticas y teóricas de las pruebas bioquímicas más usuales en el diagnóstico bacteriano, enfocado principalmente a aquéllas de origen humano.

Dar a conocer al alumno toda una serie de apéndices y pruebas bioquímicas especiales para tener una base más sólida y ampliar sus conocimientos, así como enriquecer la práctica.

HIPÓTESIS

Si se realiza una recopilación teórico-práctica de las diversas prácticas que conforman el diagnóstico bacteriológico, y se enriquece cada una de ellas con apéndices y las pruebas a realizar para cada uno de los microorganismos patógenos encada uno de los diversos análisis, se pueden obtentre mejores resultados en el aprendizaje y aprovechamiento del alumno.

INTRODUCCIÓN

Los microbiólogos clínicos y los laboratorios de microbiología clínica prestan muchos servicios, todos ellos relacionados con la identificación y el control de los microorganismos.

- El éxito en microbiología clínica depende de:
- Emplear la técnica aséptica adecuada.

Obtener correctamente la muestra del paciente infectado mediante hisopos, aspiración con aguja, intubación o catéteres, toma limpia. Cada método está enfocado a asegurar que sólo se remita al laboratorio adecuado.

- Manipular correctamente la muestra.
- Transportar con rapidez la muestra al laboratorio.

Inmediatamente después de la toma debe manipularse y etiquetarse puntualmente. Tiene una importancia capital la rapidez con que se transporta al laboratorio una vez obtenida.

Una vez llegada la muestra al laboratorio, se cultiva e identifica. Los procedimientos de identificación comprenden: la microscopía, el cultivo en medios de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, pruebas bioquímicas específicas, métodos de identificación rápida, técnicas inmunológicas.

El laboratorio de Bacteriología diagnóstica puede proporcionar una identificación preliminar o definitiva de los microorganismos basándose en:

- El examen microscópico de la muestra
- Características del cultivo y bioquímicas de las bacterias aisladas en los cultivos.
- Técnicas serológicas.

Los siguientes datos pueden sugerir la identidad inicial de una bacteria:

- La procedencia de la muestra de cultivo.
- Su aspecto microscópico
- Su patrón de crecimiento en medio selectivos, diferenciales.
- Sus propiedades hemolíticas, metabólicas y de fermentación.

En el laboratorio de microbiología clínica, los sistemas informativos están diseñados para reemplazar el intercambio de información manuscrita y para acelerar la evaluación de los datos y la confección de informes de resultados.

CARACTERISTICAS GENERALES DE BACTERIAS

Microorganismos o seres unicelulares procarióticos. Las bacterias a pesar de carecer de núcleo, como lo poseen los restantes organismos (eucariontes), es evidente tienen una estructura, o varias, que desempeñan la función de éste. Las dimensiones de dichos organismos son muy reducidas, unas 2μ de anchura y 8 de longitud en las formas cilíndricas de tamaño medio, son muy frecuentes las especies de 0.5 a 1.5μ , aunque se forman en condiciones desfavorables (deficiencia de nutrientes, cambios en el pH) y el espesor es muy variable, desde algunas fracciones de micra a 10μ .^(4,5)

CLASIFICACION

En el actual sistema de clasificación en cinco reinos (Five-Kingdom system) propuesto por Robert H. Whittaker (mónera, protista, fungi, animalia y plantae), las bacterias pertenecen al reino Mónera, cuyos miembros son organismos procariotes, caracterizándose porque las células carecen de un núcleo con una membrana diferenciada que los rodee. Las bacterias se suelen clasificar siguiendo varios criterios de utilidad en el laboratorio.^(1,2,3,6)

❖ Por su forma:

- En cocos (esféricas).
- En bacilos (forma de bastón)
- En espiroquetas y espirilos (en forma espiral)
- En cocobacilos (forma semi esférica)

- ❖ **Por sus necesidades de oxígeno:**
 - Aerobias
 - Anaerobias
 - Anaerobias facultativas
 - Microaerofilicas
 - Aerotolerantes

- ❖ **Por sus capacidades metabólicas o fermentadoras:**
 - Fermentadoras
 - No fermentadoras u oxidativas

- ❖ **Por su capacidad de formar esporas:**
 - Esporulados
 - No esporulado

- ❖ **Por las características de su pared:**

Es la clasificación taxonómica más utilizada, basada en el comportamiento que presentan frente a la tinción de Gram. La división Gracilicutes incluye a las bacterias con pared celular delgada del tipo Gram negativas; las bacterias de la división Firmicutes tienen paredes celulares gruesas del tipo Gram positivas. Entre los Mendosicutes se encuentran las Arqueobacterias, un grupo de organismos poco comunes, que incluyen a las bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas, que producen metano a partir del dióxido de carbono e hidrógeno; las halobacterias, que necesitan para su crecimiento concentraciones elevadas de sal, y las termoacidófilas, que necesitan azufre y son muy termófilas. Estos dos grupos de bacterias se subdividen a su vez en órdenes, familias y géneros. La sección 1, por ejemplo, la componen las espiroquetas, bacterias con forma espiral y paredes celulares Gram negativas y con flagelos filamentosos internos. Los Terneutes son bacterias eu carecen de pared celular tales como los *Micoplasmas*.^(1,5,6,7)

Por su movimiento:

No todas las bacterias tienen la capacidad de movimiento, pero las que lo hacen se desplazan por la presencia de:

- **Apéndices filamentosos denominados flagelos:** Estos pueden localizarse a lo largo de toda la superficie celular o en uno o ambos extremos, y pueden aparecer aislados o en grupo. Dependiendo de la dirección en que gire el flagelo, la bacteria puede moverse avanzando o agitándose en una dirección concreta. La duración de los movimientos de avance en relación con los de giro, está asociada a receptores presentes en la membrana bacteriana; estas variaciones permiten a la bacteria acercarse a determinadas sustancias, como partículas alimenticias, y alejarse de aquellas condiciones ambientales adversas.

- **Por deslizamiento:** La motilidad por deslizamiento es una característica muy extendida entre las eubacterias G(-) que existe al menos en dos bacterias G(+). El movimiento por deslizamiento exige el contacto de la célula con un sustrato sólido, que puede ser tanto otras células microbianas como diversos objetos. A menudo aparece asociado a un movimiento de rotación alrededor del eje longitudinal de la célula. Los organismos unicelulares se suelen deslizar a velocidades de 1 a 20 μm por minuto. Las células deslizantes filamentosas acostumbran a ser mucho más rápidas y algunas sobrepasan los 600 $\mu\text{m}/\text{min}$. En general la velocidad de su movimiento es proporcional a la longitud de sus filamentos unicelulares.^(6,7)

MORFOLOGIA

❖ Microscòpica

El tamaño y la forma de bacterias no son constantes, alteraciones morfológicas se observan en la mayoría de las especies bacterianas y se debe a la acción del medio ambiente, No son hereditarios y reciben el nombre de modificaciones. Las bacterias se dividen por fisión binaria.

Según su aspecto exterior las bacterias se dividen en cuatro formas fundamentales: esféricas (cocos), bastonadas (bacilos), encorvadas (vibrones, espirilos y espiroquetas), y filiformes (clamidiobacterias).

Observados con objetivo 100x

- **Cocos:** Son bacterias de forma esférica, oval (elipsoide) o lanceolada.
- **Micrococos:** Que se caracterizan por distribución solitaria, par o desordenada de las células saprófitas habitantes del mar y agua.
- **Streptococcus:** Se dividen en un solo plano agrupándose en cadenas de distinta longitud.
- **Tetracocos:** Se disponen en grupo de cuatro dividiéndose en dos planos mutuamente perpendiculares.
- **Sarcinas:** Son formas cocoides que se dividen en tres planos perpendiculares entre si adquiriendo un aspecto de paquetes compuestos por 8, 16 o más células.
- **Staphylococcus:** Se dividen en diferentes planos formando acúmulos irregulares, poseen la capacidad de provocar enfermedades en los animales y el hombre.
- **Bastonados:** Las formas bastonadas se subdividen en bacilos y clostridios.
- **Diplococos:** Se agrupan en pares después de la división.

❖ Colonial:

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias habitualmente se lleva a cabo por medio de la inspección usual del crecimiento en la superficie de placas de agar.

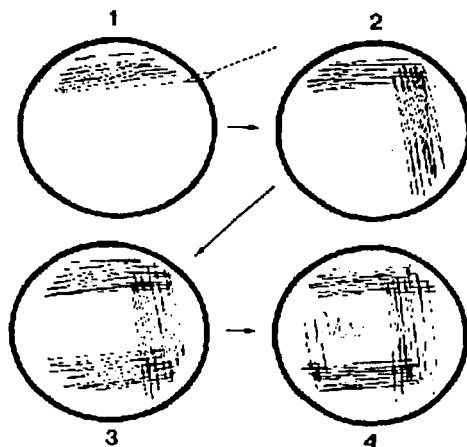
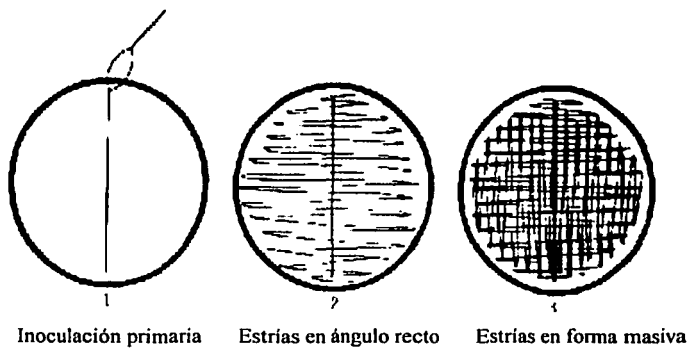
Los siguientes son algunos términos que se usan para describir las características macroscópicas de las colonias:

Con la ayuda de microscopio estereoscópico:

- **Tamaño:** Diámetro en milímetros.
- **Forma:** Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, como huso.
- **Elevación:** Plana sobreelevada, convexa, pulvinada (con forma de cojín), umbonada, umbilicada.
- **Margen:** (borde de la colonia): entero, ondulante, lobulado, lacerado, filamentoso.
- **Color:** Blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado, etc.
- **Superficie:** Brillante, opaca, etc.
- **Densidad:** Opaca, translúcida, transparente, etc.
- **Consistencia:** Mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza, etc.
- **Olor:** Tortilla, cerveza.
- **Efecto sobre el agar:** Halos de hemólisis (α, β).^(1,5,6,7)














FIGURA No. 1.

TÉCNICAS DE SEMBRADO EN PLACAS DE AGAR



Patrón en estrías para inocular placas para aislamiento de colonias bacterianas

FIGURA No. 2.
TERMINOS USADOS PARA DESCRIBIR MORFOLOGIA

Forma	puntiforme		Irregular	
	circular		rizoide	
	filamentosa		como hueso	
Elevación	elevada		pulvinada	
	plana		umbonada	
	convexa		umbilicada	
Margen	entero		lacerado	
	ondulado		filamentoso	
	lobulado		rizado	

ESTRUCTURA

Los procariotes son organismos haploides, tienen un genoma que no está separado del citoplasma por una membrana especial, carecen de mitocondrias y del complejo laminoso (aparato de Golgi). Están constituidos de un nucleóide el citoplasma, conteniendo diferentes inclusiones, la membrana y otras estructuras:

❖ **Nucleóide:** (Nucleoplasma o carioplasma). Está compuesto por:

- DNA doble hélice
- Proteínas: Proteínas parecidas a histonas
- Proteínas reguladoras: sirven para reprimir, activar, desenrollar y enrollar el material genético.
- Enzimas: topoisomerasas, polimerasas, ligasas y primasas.
- La función es la de conservación del material genético a través de la duplicación y la manutención de la homeostasis celular por un proceso de transcripción.^(3,6,7)

▪ **Adquisición de material genético:**

Ocurre por tres mecanismos muy diferentes en diversos procariontes. Al contrario de lo que es habitual entre los eucariotes, en ninguno de los casos conocidos el intercambio genético entre procariontes es un paso obligado para completar el ciclo biológico del organismo. Más bien, el intercambio genético parece ser un proceso ocasional que

Los tres mecanismos de intercambio genético se denominan: transformación, transducción y conjugación.

- **Transformación:** Cuando una bacteria muere, el DNA es liberado y fragmentado y las células receptoras lo incorporan tomándolo de esta disolución.
- **Conjugación:** Se da intercambio genético entre dos células que se hallan en contacto directo, mediante un proceso que, en todos los casos conocidos, está codificado por genes situados en plásmidos. Habitualmente, por este proceso sólo es transferido el propio plásmido desde la célula donadora a la receptora, pero a veces se transfieren también genes del genóforo.

- **Transducción:** Se transfiere DNA de una célula procariótica a otra como consecuencia de la formación de un virión de un fago aberrante en el cual parte o todo su complemento normal de DNA se sustituye por DNA bacteriano (DNA de la célula donadora). Cuando a este virión de fago se fija a otra célula bacteriana (la receptora) y le introduce este DNA, se produce el intercambio genético.^(5,6,7)

❖ **Citoplasma:**

El citoplasma de las bacterias es una mezcla dispersa de coloides que contienen agua, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, compuestos minerales y otras sustancias; posee una alta densidad y contiene granos finos de 10 a 20 nm de diámetro, compuesto por el 60% de ARN y el 40% de proteína representando ribonucleoproteínas denominadas ribosomas.

El citoplasma tiene las siguientes inclusiones: Gránulos de volutina, corpúsculos de lipoproteínas, glicógeno, granulosa, acumulaciones de pigmentos, azufre, calcio y otros.

Los corpúsculos de lipoproteínas se encuentran en forma de gotas de grasa con bastante frecuencia en diversos bacilos y espirilos. La iniciación celular los hace desaparecer, reapareciendo si las bacterias se desarrollan en medios nutritivos, ricos en hidratos de carbono. Su presencia en el citoplasma se revela mediante la coloración con sudan o fuchshina.

En el citoplasma de sulfobacterias que oxidan el sulfuro de hidrógeno, el azufre de hidrógeno se deposita en forma de gotas de estructura coloidal. El azufre tiene también importancia energética y se utiliza en la deshidrogenación anaerobia.

El citoplasma de *Micobacterias*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Actinomicetos*, *Clostridium* y de otros microorganismos contienen rapidosomas o microtubos, en las micobacterias cumplen la función de proporcionar movimiento permitiendo deslizarse por un sustrato sólido.

♦ Pared Celular:

Está formada de péptido glicano o mucopéptido, esta es una molécula exclusiva de bacterias.^(2,7)

○ PARED CELULAR DE GRAM POSITIVAS:

Formada por 6 componentes:

1.- Peptidoglicano:

Son heteropolímeros de azúcares y aminoácidos, sintetizados únicamente por los procariontes. La forma de peptidoglicano que se encuentra en eubacterias (denominada mureína) está siempre compuesta por dos aminoazúcares acetilados, la N-acetilglucosamina y el ác. N-acetilmurámico, y un pequeño número de aminoácidos cuyos representantes particulares varían entre los diferentes grupos. La forma de peptidoglicano encontrado en las arqueobacterias, la pseudomureína difiere del peptidoglicano en dos aspectos: el N-acetilmurámico nunca está presente (y en su lugar se encuentra otro ácido derivado de un aminoazúcar, el ácido N-acetilalosaminurónico), y tampoco hay aminoácidos no naturales. Los dos aminoazúcares forman cadenas de glicano compuestas por restos alternantes de N-acetilglucosamina (G) y de ácido N-acetilmurámico (M) con enlaces β -1,4. Cada una de las unidades contiene de 10 a 65 unidades de disacárido.

El peptidoglicano mide 25nm.^(5,6,7)

2.- Acidos teicoicos:

Son polímeros de dos moléculas de glicerol y ribitol que están asociados mediante enlaces fosfodiéster que pueden estar pegados o no al peptidoglicano. El ácido teicoico constituye antígenos importantes que son llamados somáticos.

La unión del peptidoglicano es por un:

- Enlace fosfodiéster al carbono 6 del Ac. Murámico.
- Unidad de enlace al N-acetilglucosamina y glicerol 3P.

3.- Ácidos lipoteicoicos

El sitio de unión de estos es la membrana citoplasmática y esta ligado a los glicolípidos.

Su función es la de captación de iones, reserva de fosfato y sirve como moléculas de adhesión a algunas superficies.

4.- Ácidos teicuronicos

Son polímeros de azúcares o aminoazúcares acilados, ramificados en presencia de ácido glucurónico, además de que no tienen grupos fosfato, no son tan antigénicos y se unen igual que el ácido teicoico.

5.- Polisacáridos

- Azúcar P
- Oligosacáridos
- Oligosacáridos unidos a polifosfato.

6.-Proteínas

En algunos bacterias las proteínas son elementos constitutivos importantes como por ejemplo:

- Proteína M: *Streptococcus del grupo A*
- Proteína A: *Staphylococcus aureus.*^(1,5)

□ PARED DE GRAM NEGATIVAS:

Formada por 6 componentes:

1.- Peptidoglicano:

Las paredes de las bacterias G (-) tienen un contenido relativamente bajo de peptidoglicano, que no suele pasar del 5-10% del peso de la pared. A diferencia de las G(+) mide 3nm. La localización de este tipo de pared fue determinada por vez primera por W. Weidel y sus colaboradores en *Escherichia coli*, quienes comprobaron que el peptidoglicano constituye la capa más externa de las múltiples que forman la pared, pudiendo aislarse como una bolsa delgada que mantiene la forma y contorno de la célula original, una vez que los demás componentes de la pared han sido separados por tratamientos adecuados.

Los peptidoglicanos de las bacterias G(-) exhiben un grado más bien bajo de entrecruzamiento entre las cadenas de glicano: muchas de las cadenas peptídicas no se entrecruzan. El grosor de la capa de glicano varía algo en los diferentes grupos de bacterias G(-). Diversas observaciones indican que es una capa monomolecular (o como máximo, bimolecular).^(6,7)

2.- Periplasma :

Está situada entre la membrana celular y la membrana externa y ha sido identificada por estudios ultraestructurales y bioquímicos. Las micrografías electrónicas muestran típicamente una región abierta a cada lado de la capa de peptidoglicano que se identifica como el periplasma.

3.- Membrana externa:

Recubriendo el delgado saco de peptidoglicano característico de las bacterias G(-) , se encuentra una capa externa que posee el grosor y estructura fina típica de una membrana unitaria. Esta capa tiene algunas propiedades físicas y químicas en común con las de la membrana celular y otras que son muy diferentes. Es una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos y proteínas pero, además, contiene grandes cantidades de un lípido especial, el lipopolisacárido (LPS), que reemplaza a los fosfolípidos en la capa más externa de ésta estructura, probablemente de modo total. Aunque químicamente el LPS es muy diferente de un fosfolípido, tiene propiedades físicas que son bastante similares, de tal manera que puede participar de forma análoga en la formación de una membrana: un extremo de su molécula es hidrófobo (se inserta en la zona hidrófoba de la membrana) y el otro hidrófilo (está en la superficie externa).^(2,1,6,7)

La importancia fisiológica de la membrana externa es triple:

1. Forma el límite externo del periplasma, la región entre las dos membranas que contiene un equipo de enzimas digestivas.
2. Presenta una superficie externa con fuerte carga negativa, lo que es importante para evitar la fagocitosis y la acción del complemento.
3. Suministra una barrera de permeabilidad que incrementa la resistencia a varios agentes tóxicos.

4.- LPS (Endotoxina):

- Son moléculas complejas con pesos moleculares superiores a 10000 y que varía ampliamente en composición química, tanto dentro de un grupo como entre grupos diversos de bacterias G(-).
- Es un compuesto antigénico y tóxico compuesto por tres regiones:
- Región I: (Azúcares) Cadena "O" específicas, unidades repetitivas de azúcares.(antígeno somático, AgO).
- Región II: (Azúcares) Porción central (Core), al menos 10 monosacáridos.
- Región III: Lípido A : Es la región hidrófoba de anclaje del LPS en la membrana y, en vez de tener los dos ácidos grasos típicos de un fosfolípido, la molécula tiene 6 ó 7 unidos a un dímero fosforilado de glucosamina. A diferencia de los presentes en los fosfolípidos, todos los ácidos grasos que se encuentran en el lípido A son saturados. Es la región tóxica.

5.- Lipoproteínas:

Se encuentra en la capa del peptidoglicano de la pared y forma un puente de anclaje para la membrana externa. La región C-terminal de esta proteína es un resto de lisina que está unido mediante un enlace peptídico a un grupo amino de un ácido meso-diaminopimélico que no está implicado en entrecruzamientos en la capa del peptidoglicano. En el otro extremo de la proteína (N-terminal) hay un resto de cisteína al que se unen ácidos grasos: uno se une por un enlace de tipo amida al grupo amino terminal, y dos más especifican un resto de glicerol que está unido a la cisteína por enlace éter con azufre.

La estructura que resulta, compuesta de las cadenas hidrófobas de tres ácidos grasos, se inserta en la cara más interna de la membrana externa, uniéndose, por consiguiente, a la capa de peptidoglicano.

6.- Proteínas de membrana externa:

La permeabilidad de la membrana externa a los nutrientes se realiza en parte por proteínas denominadas en conjunto porinas que, formando en general agregados de tres moléculas, originan canales transmembrana a través de los cuales pueden difundirse algunas moléculas pequeñas.

A.- Porinas

- OmpC: Forma poros pequeños (1.1nm)
- OmpD: Presente solamente en *Salmonella typhimurium*
- OmpF: Forma poros mayores que OmpC (1.2nm); reprimida por temperatura elevada y alta presión osmótica.
- PhoE: Formada en respuesta a disponibilidades limitadas de fosfato.

B. No porinas (Proteínas-canal específicas):

- LamB: Específica para la entrada por difusión de maltosa y maltodextrinas; inducida por maltosa; lugar de adsorción del fago lambda.
- Tsx: Específica para la entrada por difusión de nucleósidos; lugar de adsorción del fago T6.
- TonA: Específica para la entrada por difusión de ferricromo; lugar de adsorción de los fagos T1 y T6.

C.- Otras:

- OmpA: Su función específica no ha sido definida aún claramente, pero cepas mutantes que carecen de ella producen una membrana externa más frágil, por lo que parece que contribuye de algún modo a mantener la integridad estructural de la membrana

□ PARED DE ACIDO-ALCOHOL RESISTENTES.

Sus componentes son:

- Peptidoglicano 10%
- Arabinogalactán: polisacárido ramificado, unidades repetitivas de:
 - D-arabinofuronosido
 - D-galactofuronosido
 - D-galactopiranosido
- Ac. Mícólicos: 60-70%, están unidos covalentemente al peptidoglicano o libres como glicolípidos extraíbles: 30-40%. Son ácidos grasos β -hidroxilicos con una longitud de 30-50 carbonos.^(2,3)

❖ Flagelos:

Proporciona impulso a la bacteria pero es muy diferente a la de las células eucariontes. El carácter del movimiento bacteriano depende del número de flagelos, propiedades del cultivo, temperatura, composición química y otros factores.

El aparato flagelar está constituido por tres regiones distintas. La región más externa es el filamento helicoidal, de anchura constante, formado por flagelina. (La flagelina constituye un antígeno H, el cual generalmente gira en contra de las manecillas del reloj para dar movimiento recto).

Cerca de la superficie celular está unido a un gancho de diámetro algo mayor, que tiene unos 45 nm de largo, constituido por un tipo diferente de proteína, que a su vez se halla unido a un cuerpo basal alojado por completo dentro de la envoltura celular.

El cuerpo basal consta de un pequeño cilindro central insertado en un sistema de anillos. En las bacterias G (-) el cuerpo basal tiene dos pares de anillos. Los anillos del par externo (L y P) se sitúan a nivel de la membrana externa; en apariencia su función es la de servir de manguitos para la inserción del cuerpo cilíndrico a través de esta capa. Los anillos del par interno (S y M) están localizados cerca del nivel de la membrana celular; el anillo M está insertado en ella, inmediatamente por debajo, mientras que el S se sitúa justo por encima, posiblemente unido a la superficie interna de la capa de peptidoglicano. En los flagelos de bacterias G(+) sólo están presentes los anillos inferiores (S y M); aparentemente, el par superior no es necesario para apoyar el cilindro a su paso a través de la gruesa y relativamente homogénea pared G(+). Esta diferencia es significativa, dado que implica que sólo los anillos S y M son esenciales para la función flagelar.

Las bacterias se mueven principalmente para buscar sustrato o sea que tienen un movimiento quimiotáctico, fototáctico o responder a otras taxias, a favor o en contra de un gradiente de concentración que puede ser a favor de un gradiente de concentración (+) o en contra de un gradiente de Concentración (-)

La localización de los flagelos puede ser de 4 formas diferentes:

- Polar : Un solo o varios flagelos en un polo del cuerpo bacteriano.
- Lofotricos: Flagelos en ambos polos del cuerpo bacteriano (un penacho en uno o ambos lados).
- Peritricos: En todo el contorno del cuerpo bacteriano.
- Aflagelados: Sin flagelos.^(6,7)

❖ Glicocalix o Cápsula:

Esta unida a la pared celular y son todos aquéllos azúcares o estructuras bacterianas que contienen polisacáridos que se encuentra por fuera de la pared celular rodeando el peptidoglicano en G+ y la membrana externa en G-.

El glicocalix se divide en 2:

- Glicocalix capas "S": Están constituidas de glicol y glicoproteínas, comúnmente se presentan en G(-).
- Glicocalix de matriz fibrosa: Están constituidos de polímeros de azúcar, encontradas con más frecuencia en G(+).

Las funciones son contribuir a la permeabilidad selectiva y de protección celular por evasión de la fagocitosis por repulsión de cargas y también sirve como reserva metabólica.

❖ Mesosomas:

Son invaginaciones de la membrana citoplasmática, existen tres tipos:

1. M. Nucelar: Sitio de unión del material genético.
2. M. Septal: Interviene en el proceso de fisión binaria.
3. M. Periférico: Es donde se lleva a cabo la síntesis de componentes de la pared^(2,5,7)

❖ Fimbrias:

Son apéndices delgados de 2-9 nm de diámetro y 0.1-1 µm de longitud.

Existen diferentes tipos:

1. **Citoadherentes: Tipo I:** Tienen como función la adhesión a superficies, incluyendo las de las células eucarióticas, por lo que estas fimbrias a veces son esenciales para el primer paso de la infección. En estos casos, el extremo de las fimbrias se une a receptores específicos situados en la superficie de la célula eucariótica.
2. **Conjugativas: Tipo II :** (Fimbrias Sexuales): Morfológicamente son idénticas a las fimbrias de tipo I pero están compuestas por pilinas distintas como monómeros, se sintetizan en células que contienen plásmidos determinantes de la capacidad de la célula para llevar a cabo, por conjugación, transferencia genética con otras. Estas fimbrias también desarrollan una función de fijación, que en este caso es el primer paso para el proceso conjugativo.^(2,6)

❖ **Ribosoma:**

Es el sitio de síntesis proteica, está constituido de rRNA y péptidos, tiene dos subunidades:

- Subunidad mayor tiene un coeficiente de sedimentación de 50S. Está constituido de rRNA : 23S, 5S y 34 péptidos.
- Subunidad menor tiene un coeficiente de 30S. Está constituido de rRNA : 16S y 21 péptidos.

❖ **Inclusiones citoplasmáticas (vacuolas):**

- Delimitadas : están rodeadas de proteína.
- No delimitadas: están en el citoplasma y no están rodeadas de nada.^(3,7)

❖ **Esporas :**

Son formaciones esféricas u ovals, las cuales se considera que están presentes en un proceso de supervivencia bacteriana llamado esporulación, llevado a cabo por bacterias G(+) cuando se enfrentan a condiciones severas de carencia de nutrientes.

Al microscopio óptico, en fresco (sin teñir), aparecen como cuerpos esféricos, ovoides e incluso en algunas especies, cilíndricos, muy refringentes, libres, o aún incluidos en la célula vegetativa (célula madre).⁽⁶⁾

METABOLISMO BACTERIANO.

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que ocurren en las células, la principal consecuencia de dichas transformaciones en los microorganismos es la síntesis de una nueva célula.

Todos los organismos tienen la propiedad de realizar un cambio continuo de sustancias con el medio que les rodea. Para llevar a cabo los procesos de nutrición y de reproducción se requiere la presencia de materiales nutritivos a partir de los cuales los microorganismos sintetizan los componentes de su cuerpo y obtienen la energía indispensable a través de la oxidación y reducción de distintas sustancias. La luz y la materia orgánica e inorgánica sirven de fuente de energía a las bacterias.

➤ **Utilización de Hidratos de Carbono:** De acuerdo con el carácter de aprovechamiento del hidrato de carbono y la fuente energética, las bacterias se dividen en 4 grupos:

1. Fototróficas: Las que utilizan la luz como fuente de energía.
2. Quimiotróficas: Son las que emplean las sustancias químicas como fuente de energía.
3. Autotróficas: Que aprovechan el ácido carbónico (bióxido de carbono) como fuente de carbono.
4. Heterotróficas: Son aquellas que precisan el carbono orgánico (hidratos de carbono y ácidos grasos) para su nutrición.^(1,2)

➤ **Asimilación de Nitrógeno y azufre:** De los 6 bioelementos principales (carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno, fósforo y oxígeno), los metabolitos precursores carecen solamente de dos, el nitrógeno y el azufre. Estos se incorporan a los constituyentes celulares como consecuencia de determinadas reacciones de las rutas biosintéticas. Ambos elementos participan en el metabolismo biosintético en estado reducido. El nitrógeno como amoníaco (NH_3) y el azufre como sulfuro de hidrógeno (H_2S). Pero estos elementos se encuentran a menudo disponibles en el medio en otras formas químicas como constituyentes de compuestos orgánicos o en forma inorgánica en diferentes estados de oxidación.

- **Síntesis de Nucleótidos:** Los precursores de los ácidos nucleicos son los nucleósidos trifosfato de purinas y pirimidinas, que tienen todos la misma estructura general. Una base purínica o pirimidínica se une a través de átomos de nitrógeno a una pentosa; esta combinación se llama nucleósido. Se unen luego grupos fosfato en la posición 5' del nucleósido, esta combinación se llama nucleótido.

- **Síntesis de Aminoácidos y otros constituyentes celulares nitrogenados:** Para la biosíntesis de proteínas se requieren 20 aminoácidos. Sólo el aminoácido histidina tiene un origen biosintético aislado. Los otros 19 se forman a partir de rutas ramificadas, a partir de un número relativamente pequeño de metabolitos precursores.

- **Síntesis de constituyentes lipídicos a partir del acetato:** Los lípidos son una clase de constituyentes celulares que se definen por sus propiedades de solubilidad, en lugar de por su composición química. Son insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, tales como éter, cloroformo y benceno. Son químicamente heterogéneos y comprenden grasas, fosfolípidos, esteroides, isoprenoides y poli- β -hidroxibutirato.

- **Síntesis de porfirinas.**

- **Síntesis de proteínas.**

- **Síntesis de peptidoglicano**

- **Síntesis de polisacáridos.^(6,7)**

BIBLIOGRAFÍA.

1. Alcamo A. Judith. Fundamentals of Microbiology. 3a. Edición. Editorial The Benjamín/Cummings Publishing Company. Calif, U.S.A. 1998. pp. 60-168.
2. Dr. Ernest Jawetz. Microbiología médica. 12ª. Edición. Editorial El manual moderno. México, D.F. 1987. p.p. 208-215.
3. Dr. J. D. Platkin. Microbiología. 2ª. Edición. Editorial MIR. Moscú, Rus. 1989. pp. 97-109.
4. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Diagnóstico Microbiológico; 3ª. Edición; Edit. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 1992; pp 157-159.
5. Michael J. Pelzcar Jr. Microbiología. 4ª. Edición. Editorial Mac Graw Hill. México, D. F. 1990. p.p. 100-107.
6. Stainer Roger Y. Microbiología. 2ª. Edición. Editorial Reverté, S.A. México, D.F. 1996. pp 17-190.
7. Tórtora-Funke. Microbiology. 4ª. Edición. Editorial The Benjamín/Cummings Publishing Company, Inc. New York, U.S.A. 1995. pp. 227-293.

MONITOREO AMBIENTAL

Introducción:

monitoreo, tiene como objetivo asegurar la calidad del ambiente, incluyendo equipos y personal, para garantizar la esterilidad de los productos y por consiguiente cumplir con los criterios normativos en forma consistente.

El programa de monitoreo ambiental debe evaluar la efectividad de la limpieza y sanitización, la eficacia de la filtración en el sistema de aire, y la asepsia del operador. Dichio estudio en cuartos limpios controlados debe incluir cuantificación de contenido microbiano en aire, superficies, equipo, pisos, paredes y vestimenta del personal. El objetivo es obtener una estimación representativa del estatus microbiano del ambiente en un intervalo de tiempo determinado.

El monitoreo es el muestreo realizado en laboratorios de diagnóstico clínico, alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, hospitales y otros.

Un control periódico y repetitivo de las condiciones de higiene del aire ambiental y de las superficies, desde el punto de vista microbiológico, se impone hoy en día, tanto en lugares públicos como en la industria. Para lugares públicos es necesario tener bajo control las condiciones de higiene del ambiente en hospitales, escuelas, dispensarios, servicios de higiene. Es una función característica de la medicina preventiva, que aplicada de forma sistemática aumenta la seguridad de las unidades de cuidados intensivos y de los quirófanos, asegura la protección del personal expuesto a riesgos de infección en los ambientes hospitalarios y permite el control de la eficacia y de la persistencia de tratamientos desinfectantes.^(3,5)

En las industrias farmacéuticas, cosméticas, alimentarias, en los sectores de alimentos o de tratamientos de aguas (depuración), etc. Permite mejorar la producción y garantizar al personal condiciones de trabajo adecuadas.

La clase de aire que debe mantenerse en el área depende del proceso que se realice, y para ese fin la NOM 059 dice:

Las áreas limpias para la fabricación de productos estériles, debe ser clasificadas de acuerdo a sus características requeridas de aire en clase 100 (blanca bajo flujo laminar), clase 10,000 (blanca, fuera de flujo laminar) y clase 100,000 (gris claro).

La clase de aire recomendada para cuarto limpio es 100 a 10,000 sin personal ni equipo en movimiento. Para alcanzar la clase 100 o menor, se recomienda el empleo de Módulos de Flujo Laminar o Campanas de Flujo Laminar Horizontal o Vertical, según la naturaleza del proceso.

La medida de la contaminación microbiana del medio ambiente se ve influenciada por muchos factores, como el número de personas presentes, el movimiento de las mismas o el establecimiento de corrientes de aire y el sistema de medición empleado. Para muestrear el aire, se utiliza por ejemplo un aparato Biotest RC Plus (Biotest G). Este aparato consta de un cabezal y un cilindro con batería. El aire es succionado por el aparato mediante la rotación de las hélices del cabezal, y los microorganismos son impactados por la fuerza centrífuga en tiras con medio de cultivo, que se disponen circularmente en el cabezal.^(1,4)

El muestreo de las superficies consiste en pasar un hisopo embebido en buffer por un área determinada del equipo (25-30 cm) y posteriormente descargar el hisopo en un volumen medido de diluyente (utilizando medios ricos) e incubar 24hrs/37°C y posteriormente sembrar en medios de cultivo.^(2,5)

También debe realizarse cada 2-4 meses un monitoreo del personal que tiene contacto directo con pacientes inmunocomprometidos, recién nacidos, con niños (meses - 4 años con estancia en guarderías) manejadores de alimentos. Dichos análisis son: Exudado faringeo, (ya que una forma importante de transmisión de patógenos son las gotitas de saliva al hablar, toser o estornudar, es por eso de suma importancia dicho estudio; sobre todo de personal que labora en áreas como terapia intensiva, cuneros, guarderías, la recomendación de utilizar cubre bocas para disminuir el contagio. Los otros estudios que completan el diagnóstico son los siguientes: coproparasitoscópico, coprocultivo, urocultivo. En ningún caso deben ser portadores de m.o. patógenos.⁽⁶⁾

Otra de las formas de contaminación y contagio es através de las manos y el cabello, tanto en hospitales como en la industria alimenticia y farmacéutica, así como en guarderías; por lo cual es importante su monitoreo y recomendar el uso de cofia y guantes.⁽⁵⁾

OBJETIVOS DE UNIDAD

Que se determine el grado de contaminación ambiental en el laboratorio, instrumental y aparatos a utilizar en las prácticas, *como*, por medio de la selección de los parámetros a monitorear así como los medios, *para* conocer el grado de contaminación y tomar las medidas para un buen trabajo en el mismo.

OBJETIVOS DE OPERACION

1. *Que* se lleven a cabo el muestreo de las diversas zonas del laboratorio, *como*, utilizando las diferentes metodologías para monitorear aire, superficies, y personal, *para* ver el grado de contaminación, tipo de contaminantes y así sugerir un método de sanitización.
2. *Que* se realice la identificación de los diversos microorganismos (hongos, bacterias, levaduras), *como*, por medio de: morfología colonial y microscópica, pruebas bioquímicas primarias (Catalasa, oxidasa tinciones (GRAM, Azul de algodón), pruebas secundarias requeridas, *para* identificar género y especie.

MATERIAL

Medios de cultivo en caja

	Por equipo
Agar sangre	1
Agar soya tripticaseína	1
Agar dextrosa sabouraud	1
Agar Mac Conkey	1
Agar Sales manitol	1
Agar Lethen modificado	1

Medios de cultivo en tubo.

Caldo soya tripticaseína	1
--------------------------	---

Material biológico.

Sangre de carnero 5% estéril, desfibrinada.

Reactivos

Safranina
 Lugol
 Alcohol acetona
 Cristal violeta
 Aceite de inmersión
 Agua destilada estéril
 Azul de algodón
 Benzal 1:100
 Fenol 5%

Otros

Cubre objetos
 Porta objetos
 Hisopos estériles
 Cubre boca
 Mecheros
Equipo
 Baño maría
 Microscopio óptico
 Microscopio estereoscópico
 Autoclave
 Estufa
 Refrigerador

TÉCNICA

Mesa sin desinfectar:

Muestreo: Seleccionar un área de 25 cm² . Humedecer un hisopo en CN y pasarlo sobre la zona elegida.

Incubación: Colocar el hisopo dentro del CN e incubar 24 hrs./37°C.

Sembrado: Sacar el hisopo y sembrar sobre la superficie de los medios seleccionados (AST, ADS, Mc), sembrando en forma radial (en toda la superficie) en cada uno de los medios e incubar a 37°C /24 hrs. Posteriormente realizar la identificación.

Mesa desinfectada:

Muestreo: La superficie monitoreada sin desinfectante, se desinfecta con benzal y dejar que actúe por 5-10 minutos, para posteriormente humedecer un hisopo en CN y pasarlo sobre la zona seleccionada.

Sembrado y conteo: Se llevan a cabo de igual manera que en la mesa sin desinfectar.

Aire: (Puerta y mesa adelante) , Refrigerador y Estufa:

Muestreo: Abrir las cajas (AST y ADS) y exponerlas en el medio ambiente por 30 minutos.

Manos sin asepsia:

Muestreo: Colocar las manos directamente sobre los medios (AST, ASM, AS, ADS, AMc) , e incubar 24 hrs. /37°C.

Manos con asepsia:

Muestreo: Lavarse las manos y colocarse benzal dejándolo actuar por 5 minutos para posteriormente colocarlas sobre los medios (AST, ASM, AS, ADS, AMc), e incubar 24 hrs./37°C.

Hablar sin cubrir boca:

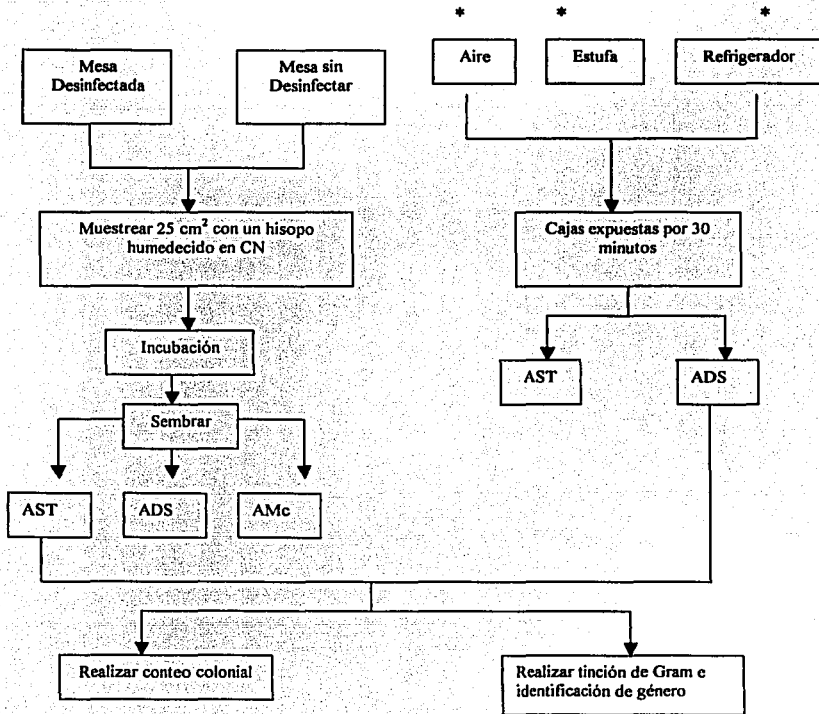
Muestreo: Abrir las cajas y cerca del mechero hablar, toser directamente sobre los medios, incubar a 37°C/24 hrs.

Hablar con cubrir boca:

Muestreo: Colocarse un cubre boca y repetir la misma operación que hablando sin cubrir boca.

Cabello:

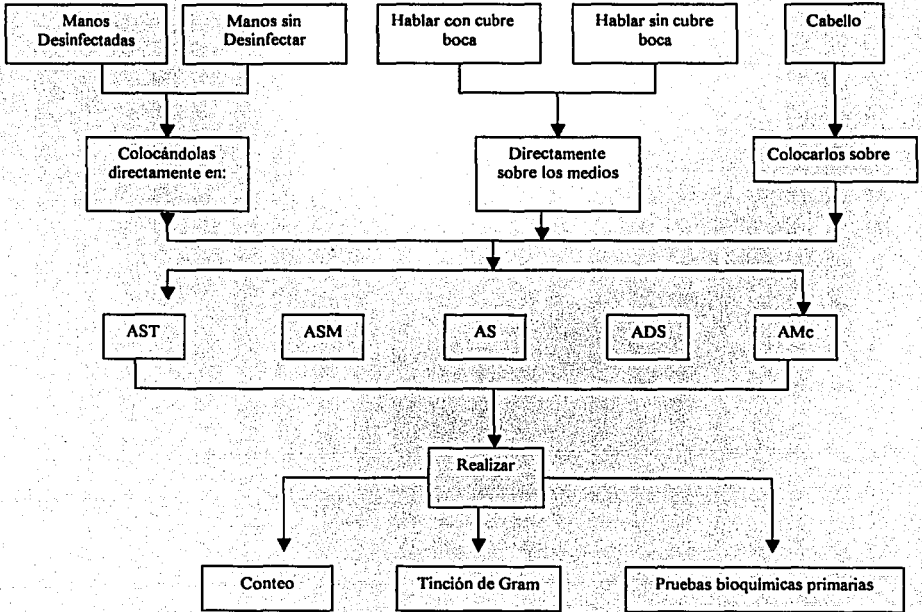
Muestreo: Colocar un cabello sobre las placas de agar presionando un poco y dejar incubando a 37°C/24 hrs.

DIAGRAMA DE TRABAJO 1

¡NOTA: El conteo en todas las zonas monitoreadas es igual se cuenta el número de colonias presentes en cada uno de los medios. Y realizar la identificación de éstos.

Existen otros métodos menos convencionales y más sofisticados para este tipo de monitoreo (Ver Anexos 3, 4 y 5), pero debido a las limitaciones con que cuenta el laboratorio no se pueden llevar a cabo, ya que dicho manual fue diseñado en base a los insumos y presupuesto para el mismo.

DIAGRAMA DE TRABAJO 2



HOJA DE RESULTADOS**EQUIPO:****FECHA:**

<p><u>MESA DESINFECTADA</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>	<p><u>MESA SIN DESINFECTAR</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>
<p><u>ESTUFA</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>M.O. ENCONTRADO:</p>	<p><u>REFRIGERADOR</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>
<p><u>HABLAR CON CUBRE BOCA</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>	<p><u>HABLAR SIN CUBRE BOCA</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>
<p><u>AIRE</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>	<p><u>CABELLO</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>
<p><u>MANOS DESINFECTADAS</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>	<p><u>MANOS SIN DESINFECTAR</u></p> <p>RESULTADO:</p> <p>GRADO DE CONTAMINACION:</p>

BIBLIOGRAFIA

1. Collinds and Lynels. Microbiological Methods. Editorial Butterworth Heinemanni. 7ª edición. 1995. pp. 160-179.
2. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA (American Public health Association), 1996. Ed. Speeccc,M. Pp 45-67.
3. Microorganismos in Foods 2: Sampling for microbiological analysis. Oprinciples and specific applications. 1996.
4. ICMSF (International comission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. Ed. Ingram,M.
5. (1116) Microbiological Evaluation of Cleanrooms and other controlled enviroments, Pharmacopeial Forum. Vol. 21. No. 2. 1995.
6. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater APHA, 1998. Ed. Rand.M.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA

Introducción:

México es un país que en la actualidad confronta una destacada escasez y contaminación de sus fuentes naturales de agua.

Por estar el agua íntimamente ligada a la vida, lo más importante es su calidad, lo cual es alarmante debido al grado de contaminación que en nuestros días han alcanzado diversos mantos acuíferos.^(4,6)

La contaminación del agua abarca un conjunto de fenómenos muy diversos, se trata de una alteración desfavorable de nuestro medio ambiente, en gran parte debido a la civilización, por efectos directos e indirectos. La contaminación afecta a un grupo de seres que forman un sistema ecológico, es decir, un conjunto de organismos y sus relaciones recíprocas con el ecosistema.

La contaminación tiene íntima relación con diversos factores:

1. Crecimiento demográfico
2. Desarrollo industrial
3. Urbanización.

Los tres puntos anteriores presentan una evolución rápida y se suceden uno en función del otro^(2,7,9)

Entre los problemas más notables que produce la contaminación del agua destacan:

1. Falta de agua potable y utilizable en la industria.
2. Pérdida de importantes fuentes de proteínas, especialmente del mar.
3. Condiciones favorables a las enfermedades y epidemias.
4. Aumento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares en los núcleos urbanos.
5. Aumento de sustancias tóxicas y radioactivas en la materia viva.

En consecuencia, en algunas industrias se están diseñando procesos mediante los cuales el agua se puede reciclar numerosas veces dentro de una misma planta, antes de limpiarla y liberarla al medio ambiente^(1,3,8)

Todas las aguas naturales, dulces o saladas, tienen una población específica de bacterias adaptadas al medio ambiente, viviendo y reproduciéndose en ella.

En general, el número de bacterias del agua es suficientemente pequeño y más aún, la mayoría de ellas no crecerán en los medios utilizados para examinar la calidad sanitaria del agua.

El número de bacterias oscila desde unas cuantas por mililitro hasta un orden de elevada magnitud . Las cuentas altas son el resultado de la presencia de otro tipo de materia orgánica, como son, la descarga de aguas negras y desechos industriales.

Unos de los aspectos más importantes en la calidad del agua es el destino que tengan los patógenos, provenientes de los desperdicios humanos en el agua.

Lo que le sucede a las bacterias al contaminar las aguas naturales depende del tipo de condiciones ambientales que prevalezcan en ellas , como son:

a).- Materia Orgánica: Las bacterias saprófitas se multiplican en el agua que contiene materia orgánica, pero las especies patógenas son más exigentes y no alcanzan a reproducirse . Cuando las aguas negras son descargadas en una corriente, se eleva la concentración de materia orgánica ocasionando como respuesta, el crecimiento de muchos saprófitos y un incremento de bacterias patógenas. La competencia en tales circunstancias favorece a los saprófitos más que a los patógenos

b).- Temperatura: Las bajas temperaturas disminuyen la velocidad de la mayoría de las reacciones biológicas, mientras que a temperaturas cercanas al punto de congelación, la competencia es prácticamente nula.

c).- Agentes tóxicos: Las sustancias químicas de las fábricas, refinerías, minas y molinos de pulpa son los agentes más comunes que reducen la actividad microbiana

Estos contaminantes se consideran los más nocivos, ya que no son materiales naturales a los cuales las bacterias estén adaptadas para utilizarlos como alimento, por lo que su desaparición es lenta y difícil.

Algunos materiales que han causado dificultades en el medio ambiente son: el cianuro, que es un inhibidor de la respiración, varios ácidos y fenoles, que a su vez, se utilizan como agentes antibacterianos.

d).- Luz: Tiene un efecto destructivo sobre las bacterias que están en el agua y que se encuentran expuestas, sin embargo, la luz ultravioleta que es la más efectiva no penetra a las profundidades como lo hacen los rayos con mayores longitudes de onda^(5,6,8,9)

Los organismos patógenos al hombre que se pueden transmitir por ingestión de agua incluyen bacterias, virus y protozoarios.

Estos microorganismos se desarrollan en el intestino y abandonan el organismo en las heces. Entonces la contaminación fecal de los suministros de agua puede ocurrir y si esta no es tratada adecuadamente, los patógenos entran a un nuevo huésped al consumir el agua. Si esta se ingiere en grandes cantidades, puede ocasionar problemas gastrointestinales aún, si solamente contiene una baja cantidad de organismos patógenos.

Las bacterias entéricas se deben eliminar en forma efectiva del agua durante los procesos de purificación de modo que no deben estar presentes en el agua potable^(1,4,6,7).

Dependiendo de su uso existen diferentes calidades de agua importantes:

1. Potable
2. purificada
3. desionizada
4. destilada
5. grado inyectable
6. tratadas
7. negras.
8. residual

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se se lleve a cabo el análisis microbiológico de aguas potables y purificadas (proporcionadas por el alumno) **como**, por la utilización de dos métodos tradicionales marcados por la NOM-127-SSA1-1994 (NMP y Ready cult) **para** ver la presencia o ausencia de coliformes totales, fecales, mesófilos y llegar a la identificación del microorganismo indicador de contaminación si la hay y comparar los resultados con los de la NOM establecida basada en el rechazo o aceptación de la muestra.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. **Que** se realice la dechloración del agua, **como**, con la ayuda de un quelante del cloro (tiosulfato de sodio), **para** impedir que intervenga en las pruebas posteriores del análisis.
2. **Que** se realice el método de tubo múltiple en serie de tres o NMP (número más probable) y Ready cult, **como**, llevando a cabo los pasos indicados en la metodología, **para** determinar coliformes totales, coliformes fecales, *Pseudomonas* y mesófilos.
3. **Que** se determinen coliformes totales, coliformes fecales, **como**, por la utilización de compuestos coloridos y fluorescentes.

MATERIAL**Medios de cultivo en caja.**

	Por equipo
Agar Mac Conkey	1
Agar cuenta estándar o Lethen	4
Agar cetrimida1

Medios de cultivo en tubo

	Por equipo
Caldo lactosado rojo de fenol conc. Simple (100%)	6
Caldo lactosado rojo de fenol doble conc. (150%)	3
Caldo bilis verde brillante	5
Caldo nutritivo	1
Citratos	1
SIM	1
Rojo de metilo	1
Vogues Proskauer	1
Medio de O/F	2

De estas pruebas se utiliza 1 tubo por equipo y 10 tubos por grupo de cada una.

Reactivos:

Rojo de metilo
 Reactivo de Ehrlich o Kovacs
 Alfa naftol 5%
 Hidróxido de potasio 40%
 N-N-tetrametilparafenilendiamina
 Peróxido de hidrógeno
 Agua destilada
 Aceite de inmersión

Otros

Pipetas de 1 ml., estériles
 Pipetas de 10 ml., estériles
 Campanas Durham 15 por equipo y 150 por grupo
 Una bolsa o botella estéril con tiosulfato de sodio.
 Porta objetos
 Cubre objetos
 Asa bacteriológica
 Palillos estériles
 Papel filtro estéril

TÉCNICA

Declaración del agua:

Colocar el agua en bolsas comerciales o en botellas estériles que contengan tiosulfato de sodio 10% (quelante del cloro) y dejar reposar 15 minutos.

Prueba presuntiva: (Coliformes totales)

Serie 1:

Formada por 3 tubos con campana Durham que contienen 20 ml., de CLRFDCC a los cuales se les agrega 10 ml., de la muestra a cada uno.

Serie 2:

Formada por 3 tubos con campana Durham que contienen 10 ml., de CLRFDCC, a los cuales se les agrega 1 ml., de la muestra a cada uno.

Serie 3:

Formada por 3 tubos con campana Durham que contienen 10 ml., de CLRFDCC, a los cuales se les agrega 0.1 ml., de muestra a cada uno.

Interpretación: Observar producción de gas dentro de las campanas Durham y cambio de color de rojo a amarillo (+). Determinar el No., de tubos de cada serie que haya sufrido dichos cambios.

Prueba confirmativa: (Coliformes fecales):

Tubos Positivos: Utilizar cada uno de los tubos positivos en la prueba presuntiva y pasar unas asadas (0.1 ml) a 2 tubos de CBVB 2% con campana Durham.

Incubación: De cada dos tubos inoculados:

1 tubo incubarlo a 37°C/48 hrs.

1 tubo incubarlo a 45°C/ 48 hrs.

Interpretación: Ver formación de gas dentro de las campanas Durham, lo cual indica presencia de coliformes fecales y se considera prueba positiva.

Sembrado: Pasar unas asadas de los tubos positivos de CBVB a cada uno de los agares (AMc, AEMB, AST), por dilución, e incubar a 37°C/24 hrs.

Identificación: Correr pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, motilidad, O/F, Gram, citrato, indol, MR-VP), para identificar el género y la especie.

Mesófilos:

Sembrado: Colocar en dos cajas petri 1 ml., de la muestra y adicionar 20 ml., de agar cuenta estándar en cada una.

Incubación: Colocarlas 2 cajas a 37°C/48 hrs, y 2 a 25°C/48 hrs.

Interpretación: Realizar el conteo colonial (25-250 colonias).

*** Pseudomonas:**

Sembrado: A un tubo de CN agregar 5 ml., de la muestra e incubar 48 hrs./37°C, y sembrar en agar Cetrimida e incubar nuevamente 24hrs./37°C.

Interpretación: Observar morfología y posible pigmentación. Realizar pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

* También es utilizado el método de filtración por membrana para el recuento de Pseudomonas. Es un método altamente reproducible, puede usarse para analizar volúmenes de muestra relativamente grandes y se obtienen resultados en menor tiempo. Pero debido a las limitaciones del laboratorio se sigue una técnica más simple que arroja resultados satisfactorios y con costos menores.

Tipo de agua	UFC	Patógenos
Purificada	No más de 800 ufc/100ml	Ausencia
Inyectable	50 ufc/100 ml.	Ausencia
Para uso farmacéutico	500 ufc/100 ml.	Ausencia

DIAGRAMA DE TRABAJO 1

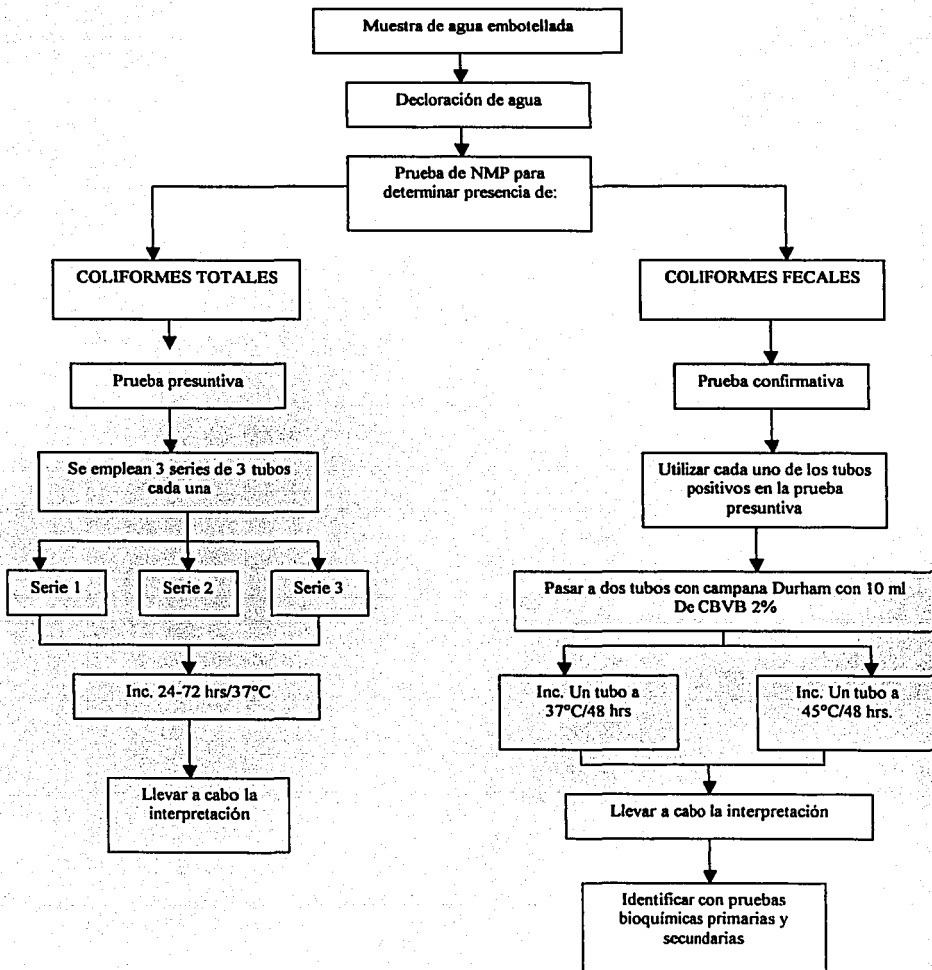
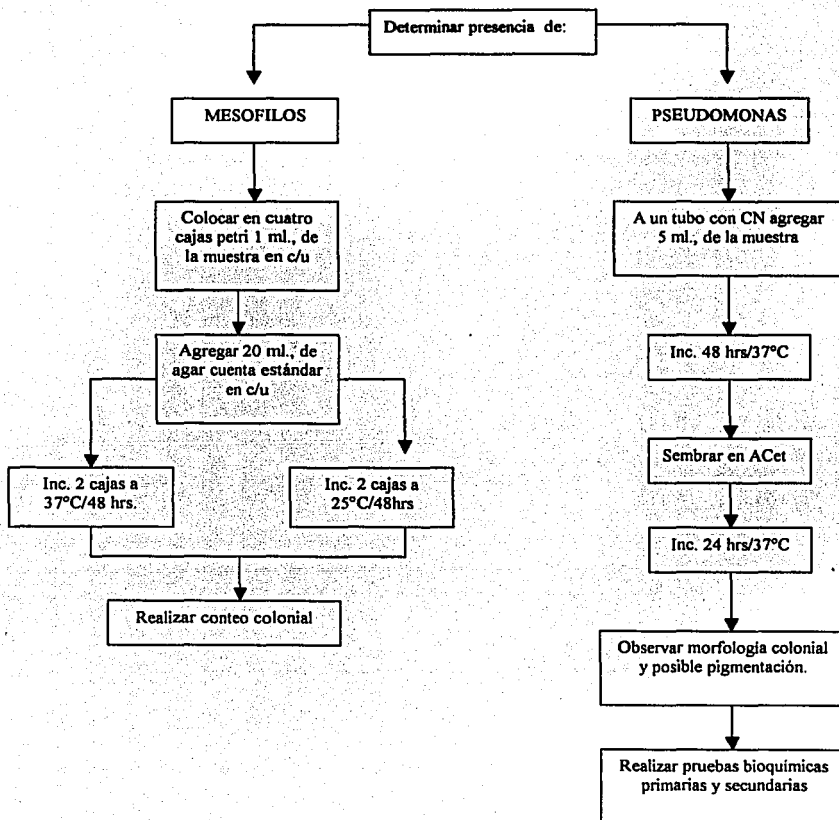


DIAGRAMA DE TRABAJO 2



HOJA DE RESULTADOS**EQUIPO:****FECHA:**

DETERMINACION	RESULTADO
NMP	
Coliformes Totales	
Coliformes Fecales	
Presencia de Pseudomonas	
Diagnóstico	

Ver anexo No. 7 para checar resultados de NMP.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alcántara Barbosa Ma. Consuelo; Química de hoy; Edit. Mac Graw Hill; México, D.F.; 1992.
2. Alvarez Rosas José, Criterios para el uso y manejo de las aguas residuales en la Agricultura; memorias Querétaro; México, D.F.; 1996.
3. Brow Alfred E.; Experimental Microbiology fundamentals and applications; 2ª. Edición; Edit.
4. Dicksin, T.R.; Química y enfoque ecológico; Edit. Limsa; México, D.F. 1990.
5. Fuerts Frobisher; Microbiología; Edit. Interamericana; México, D.F. ; 1990.
6. Guerra Luis Manuel; Agua y energía en la Ciudad de México, perspectivas para el nuevo milenio; Fundación Friedrich Ebert; México, D. F. 1995.
7. Mc. Bee-TrmpleWalter; Introducción a la Microbiología; 3ª. Edición; Edit. CECSA; México, D.F; 1990.
8. Mc. Junkin F.Eugene; Agua y Salud Humana; Edit. Limusa; México, D.F.; 1996.
9. Reasoner Donald J.; Drinking Water Microbiology research in the United States an overurew of the past decade; Wat. Sci.Tech, Vol. 20; No. 11/12; 1997.
10. Norma oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. "Salud ambiental, agua para uso y cosumo humano- límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO.

Introducción:

Los medios de cultivo se utilizan para una gran variedad de propósitos en el laboratorio. Su rendimiento debe por ende juzgarse aceptable para asegurar que sirvan para los fines para los cuales se han preparado.

Los microorganismos varían en sus requerimientos de desarrollo, estos necesitan fuentes de nitrógeno, carbono y oligoelementos como el manganeso, molibdeno, zinc, cobre, cloro, etc., mientras que otros más exigentes tienen necesidad de factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas, hidrolizados de proteínas en forma de peptonas, que proveen componentes nitrogenados en forma accesible, se obtienen por tratamiento con ácidos, álcalis o enzimas^(3,5,10,11,12)

Antes de la década de los 50's, casi todos los laboratorios fabricaban sus propios medios de cultivo, partiendo frecuentemente de los ingredientes básicos crudos. Actualmente la forma más común de preparar medios de cultivo es a partir de medios deshidratados, los cuales solo requieren de agua para su reconstitución, se presentan en forma de polvo o granulado.

También pueden emplearse medios deshidratados con aditivos como, sangre, suero u otros factores de desarrollo generalmente son materiales inestables y sirven para respaldar el desarrollo de microorganismos exigentes^(3,5,10,11,12)

La responsabilidad del **Control de calidad** en la preparación de los medios de cultivo recae en el fabricante hasta el momento de su venta al consumidor.

El **control de calidad** consiste en una evaluación sistémica del trabajo para asegurar que el producto final se ajuste, hasta un grado aceptable a límites de tolerancia previamente establecidos, donde finalmente se proporcionan resultados verídicos (únicos).

Para realizar el control de calidad de medios de cultivo es necesario considerar los siguientes puntos básicos:

Personal: Este debe ser una persona capacitada en el área específica y con un entrenamiento práctico.

Material de vidrio: Debe estar limpio, seco y libre de cualquier tipo de contaminantes, ya que la presencia de éstos puede afectar los resultados.

Materia prima: Esta debe presentar características homogéneas en el tamaño de partícula, color y no presentar apelmazamiento. El envase debe de ser de tapa de aluminio, frasco de vidrio ámbar, composición completa en etiqueta, debe precisar fecha de caducidad, indicación clara de la preparación, así como el número y lote.

El control de calidad para los medios de cultivo debe, en el análisis final, asegurar que un medio respalde el desarrollo de los microorganismos, inhibir el desarrollo de microorganismos comensales, exhibir una respuesta bioquímica típica, ser estable y tener un tiempo de conservación razonable^(2,8, 9)

Para el control de calidad se deben realizar pruebas de:

Esterilidad:

Pocos son los medios utilizados sin esterilización final, casi todos los medios deben estar estériles cuando se inoculan. Cada lote de medio, preparado en el laboratorio o proveniente de una fuente comercial, debe ser controlado para asegurar su esterilidad. Esto se realiza retirando 1-5% del lote y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35°C durante 48 hrs. Si aparecen contaminantes en el medio puede ser resultado de esterilización inadecuada y se debe adquirir un lote nuevo.

Pruebas de promoción e inhibición de crecimiento

Determinar la capacidad del medio para respaldar el desarrollo del microorganismo inoculando con una concentración baja (10⁻⁶) que nos permita ver la funcionalidad del medio. Un error frecuente del control de calidad es el uso de un inóculo concentrado que puede producir un desarrollo desorientador, para lo cual es necesario estandarizar ésta prueba, mediante el empleo de una técnica que nos ayude a dicho propósito como la técnica de Miles & Misra.^(6,10)

OBJETIVOS DE UNIDAD

Que se lleve a cabo la técnica de Miles & Misra, *como* por medio de la inoculación de cepas ATCC en los medios de cultivo a probar, *para* ver si los medios están viables y promueven o inhiben el crecimiento y además si presenta la morfología colonial y respuesta específica de los microorganismos tipo probados.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. *Que* se realice una suspensión de cada una de las cepas a utilizar, *como*, colocando una asada en 4.5 ml., de solución salina fisiológica estéril, *para* igualarlos al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, y de ésta concentración realizar diluciones hasta 10^{-4} los cuales se utilizarán para las pruebas de promoción e inhibición de crecimiento.
2. *Que* se ambienten las cajas, *como*, colocándolas a temperatura ambiente por una hora antes de ser evaluadas, *para* así permitir la promoción del crecimiento.
3. *Que* se seleccionen los lugares en la caja donde se van a sembrar las diluciones de las diferentes cepas *como*, dividiendo las placas en cuadrantes, *para* realizar las lecturas y comparación de los resultados obtenidos.

MATERIAL**Equipo:**

Microscopio óptico
Autoclave
Vortex
Baño María
Horno Pasteur
Estufa bacteriológica
Asas bacteriológicas calibradas (0.01 y 0.001)
Mecheros
Tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Medios de cultivo en caja:**Por equipo**

Agar sangre	1
Agar chocolate	1
Agar brovacin	1
Agar EMB	1
Agar verde brillante	1
Agar XLD	1
Agar sulfito bismuto	1
Agar Mac Conkey	1
Agar sales manitol	1
Agar Mueller-Hinton	1
Agar casoy	1
Agar cetrimida	1
Agar Biggy	1
Agar Tayer Martin	1

Reactivos:

Cloruro de sodio
Glicerol
Cristal violeta
Alcohol al 70 y 90%
Acetona
Lugol
Safranina
Aceite de inmersión
SSF estéril

Cepas: ATCC

Salmonella enteritidis 5188
Enterobacter aerogenes 13048
Staphylococcus aureus 6538
Staphylococcus epidermidis
Pseudomonas aureginosa 9027
Candida albicans 10231
Streptococcus β -hemolítico grupo A. 19615
Haemophilus influenzae
Escherichia coli w3350

Cristalería:

Matraz Erlenmeyer
Tubos de ensayo de fondo plano
Probetas graduadas
Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml.
Vasos de precipitado
Porta y cubre objetos

TÉCNICA

1. Sembrar las cepas de los diferentes m.o. 24 horas antes, en placas de agar rico (Casoy, AST, AMH, etc.).
2. Rotular la serie de tubos del número 1 al 5 respectivamente para cada m.o.
3. Dividir en cuadrantes (4) las placas, posteriormente a esto, colocarlas durante menos de una hora en la estufa a 35°C. Se emplean tres placas por medio de cultivo a evaluar.
4. Se prepara una suspensión de la cepa del m.o. igualando la turbidez con el tubo número 0.5 del nefelómetro de Mac Farland que equivale a 1.5×10^8 UFC/ml.
5. De este tubo se toma un volumen de 500µl con micropipeta y se adiciona a uno de los tubos con SSF estéril (tubo número uno = dilución 10^{-1}). Homogenizar.
6. De este último tomar un volumen de 500µl con micropipeta y adicionarlos a otro tubo con SSF estéril (tubo número dos = dilución 10^{-2}). Homogenizar, de este modo se realizan las diluciones hasta el tubo número 5 = dilución 10^{-2} .
7. Para conocer la dilución a emplear en el ensayo, se debe distribuir 10µl de cada una de las diluciones en placas del medio de referencia (medio rico). Dejar que se difunda en el medio y posteriormente realizar el barrido o estriado con la ayuda de una asa bacteriológica estéril. Incubarlas durante 18-24 hrs., a una temperatura de 35-37°C.
8. Realizar la lectura de las placas (conteo manual) se recomienda que el número de colonias sea contables.
9. Posteriormente, al encontrar la dilución a emplear se realiza con cada uno de los medio a evaluar (selectivos y diferenciales). con 2 ó 3 placas de cada medio, es suficiente observar la cuenta de recuperación.

1. Distribuir 10 μ l de la dilución elegida para el ensayo de Control de Calidad en los diferentes medios a evaluar. Para realizar esto, se debe manejar según sea el medio de cultivo: un m.o. que debe crecer, uno que debe diferenciarse del anterior y por último otro que no debe crecer. El último cuadrante se emplea como área de esterilidad.
2. Permitir que se difunda el líquido en el medio de cultivo, posteriormente realizar un barrido o estriado para una mejor lectura, este se realiza con asa bacteriológica. Posteriormente se incuban las placas durante 18-24 hrs., a una temperatura de 35°C, realizar lectura de las placas (conteo manual) se recomienda que el número de colonias oscile entre 20-30 por cuadrante.
3. El ensayo debe realizarse al mismo tiempo en un medio de referencia para asegurar el crecimiento del m.o. (medio rico como Casoy, AST, AMH, etc.) y empleando la misma dilución que para cada uno de las cepas de m.o. empleados para comparación de la recuperación bacteriana en los medios de cultivo evaluados y de referencia.

DIAGRAMA DE TRABAJO

**Prueba de promoción e inhibición de crecimiento
"Técnica de Miles & Miara"**

Cepas ATCC de 24 hrs de crecimiento en placas de AST : *Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella penumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis*

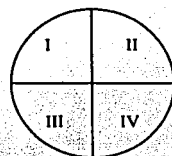
Suspensión en SSF estéril (4.5 ml)

Igualar al tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland

Hacer diluciones decimales
 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ..
Homogenizar cada dilución

Las placas de medio a probar y tubos de bioquímicas se colocan a temperatura ambiente una hora antes de ser evaluadas

Dividir en cuadrantes las placas petri que contienen el medio de cultivo a evaluar



Se distribuyen 10 μ l de la suspensión en cada cuadrante

Dejar difundir la suspensión en el medio (15 minutos)

Inc. De 24-48 hrs a 35°C

Estriar cada cuadrante para coadyuvar al conteo de las colonias

Realizar el conteo de las colonias

HOJA DE RESULTADOS.**EQUIPO:****FECHA:**

Medio de cultivo	Esterilidad	No. De m.o. cuadrante	Inhibicion de Crecimiento	Respuesta Bioquímica
AGAR SANGRE				
AGAR CHOCO LATE				
AGAR BROLA CIN				
AGAR EMB				

Medio de cultivo	Esterilidad	No. De microorganismos	Inhibición de crecimiento	Respuesta Bioquímica
AGAR VERDE BRILLANTE				
AGAR XLD				
AGAR SULFITO BISMUTO				
AGAR Mac CONKEY				
AGAR SALES MANITOL				

r Anexo No. 8 para checar resultados.

Medio de cultivo	Esterilidad	Número de unidades viables	Inhibición de crecimiento	Respuesta bioquímica
AGAR CASOY				
AGAR CETRIMI DA				
AGAR TAYER- MARTIN				
AGAR BIGGY				
AGAR MUELLER HINTON				

Prueba bioquímica	Ejemplo de uso	Medio de cultivo
Agar urea de Christensen		
Agar citrato de Simmons		
Sacarosa		
Maltosa		
Lactosa		
Descarboxilasas lisina		
Arginina (dihidrolasa)		
Desoxirribonucleasa (DNAasa)		
Indol (kovac)		
Agar hierro de Kligler		
Agar lisina-hierro		
Agar triple azucar-hierro		
Malonato		
Motilidad (medio semisólido)		
Caldo o agar nitrato		
Fenilalanina deaminasa		
Voges Proskauer		
Rojo de metilo		

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez M.C. y Mendoza, E.S.; Manual Básico de Bacteriología; Edit. UNAM; México, D.F.; 1994; pp 21-57.
2. Avila V.G.; Actividad Profesional de una Química Farmacéutica Bióloga en el área de ventas de una empresa transnacional; Tesis Químico Farmacéutico Biólogo; UNAM; fes-Cuautitlán; 1997.
3. Bailey S; Diagnóstico Microbiológico; 7ª. Edición; Edit. Panamericana; México, D.F.; 1989; pp 65-68, 118-132.
4. Bennington, J.T. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico, Edit. Médica panamericana; Buenos Aires, Argenita; 1991; pp 50-51, 872-875.
5. Brock, D.T.; Microbiología; 4ª. Edición, Edit. Prentice-Hall Hispanoamericana, México, D.F.; 1993.; pp 131-138, 360-363.
6. Collins, C.H., Lynne, P.M; Microbiological Methods, 7ª. Edición; Edit. Butterworth & Hememann; Londres, Inglaterra; 1995; pp90-92.
7. Fritz, J.S.; Química Analítica Cuantitativa; 3ª. Edición; Edit. Limusa, México, D.F.; 1979; pp 604-607.
8. Giral, C.; y Castañeda, P.; Manual de medios de validación de Medios de cultivo de SSA, Edit. SSA; México, DF., 1990; pp 12-15.
9. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Diagnóstico Microbiológico; 3ª. Edición; Edit. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 1992; pp 157-159.
10. Lennette, E.H; et. Al, Manual de microbiología Clínica; 4ª. Edición; Edit. Médica Panamericana; México, D.F.; 1994; pp 1204-1309.
11. Medios de Cultivo Merck; Merck de México, 1994.; Apartado 8619, 0600.: México, D.F
12. Medios de Cultivo (Criterios de calidad); Merck de México S.A.: 1990: apartado 8619, 0600, México D.F

COPROCULTIVO

Introducción:

La alta incidencia de diarrea en la población en general junto con sus elevados índices de morbilidad entre determinados grupos etarios (niños y ancianos) hacen que este tipo de patología constituya un motivo de especial interés desde el punto de vista clínico como microbiológico. (4,6)

El número de microorganismos implicados en cuadros entéricos se ha ampliado durante los últimos años debido, entre otros factores, al mejor conocimiento de la clasificación taxonómica de los diferentes agentes etiológicos y al desarrollo de métodos cada vez más sensibles. La aparición de agentes infecciosos poco comunes o casi desconocidos en nuestro entorno se ha visto favorecido por la mayor frecuencia de viajes intercontinentales y el aumento de los movimientos migracionales. Finalmente, el incremento de pacientes inmunodeprimidos (SIDA y tratamientos inmunosupresores) ha supuesto un elemento de capital importancia en relación con este grupo de enfermedades infecciosas. (1,3,5)

Ante la sospecha de un cuadro de infección gastrointestinal debe hacerse una detallada historia clínica y un correcto estudio microbiológico. Los antecedentes epidemiológicos (edad, viajes recientes, aparición esporádica o como parte de un brote, tipo de alimento sospechoso, periodo de incubación) la existencia de factores predisponentes (inmunosupresión), la presencia de signos y síntomas clínicos (fiebre, dolor abdominal, manifestación de náuseas y vómitos) y el tipo de diarrea (acuosa, mucosa o sanguinolenta) pueden orientar acerca del microorganismo implicado. No obstante, el diagnóstico definitivo clínicamente se puede obtener mediante pruebas de laboratorio. (1,2,4)

El uso reciente de antibióticos, la pérdida de peso en el último tiempo, la presencia de una enfermedad son informaciones valiosas para la realización de un coprocultivo.

Diversos agentes antiguos que producen nuevos síndromes y la disponibilidad de un amplio conjunto de medios de cultivo hacen que el enfoque diagnóstico de laboratorio de las enfermedades diarreicas resulte un tanto confuso. La extremada especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo permite estudiar diferencias entre cepas de una misma especie bacteriana, indistinguibles entre sí por lo que respecta a otros criterios fenotípicos. (5)

Se han caracterizado ampliamente tres clases de antígenos de superficie en las enterobacterias del grupo I, (los miembros de este grupo son habitantes del tracto intestinal del hombre y otros vertebrados): los antígenos O que representan la parte del polisacárido de los lipopolisacáridos de la capa externa de la pared celular, los antígenos K, que son polisacáridos capsulares y los antígenos H, que son las proteínas flagelares. Muchos de estos organismos poseen dos conjuntos de determinantes genéticos de diferentes antígenos flagelares, susceptibles de alternarse en cuanto a la expresión fenotípica, fenómeno derivado de la variación de fase. En una determinada célula los flagelos son de un tipo antigénico, pero a medida que la célula se multiplica, aparecen con cierta probabilidad, variantes del otro tipo posible. Los cultivos de estas cepas bifásicas contienen por tanto, dos conjuntos de antígenos H específicos. En el género *Salmonella* el análisis detallado de los antígenos O y H ha hecho posible establecer cientos de serotipos, estos análisis en el caso de *Escherichia* y *Shigella* son más limitados. El serotipo de una cepa patógena de *Salmonella* es un marcador que permite su reconocimiento (y posibilita por tanto, seguir su transmisión), imposible de realizar por otros caracteres fenotípicos.⁽⁶⁾

Toma de muestra:

Las muestras fecales (3-5g del tamaño de una nuez) deben recogerse en envases limpios (no necesariamente estériles), pueden cubrirse con una tapa bien ajustada. Debe evitarse la contaminación con orina.

Debido a que ciertas cepas de especies de *Shigella* son susceptibles a bajas temperaturas y a la desecación, los hisopados rectales pueden ser más efectivos para la recuperación de estas bacterias.

El hisopo rectal se introduce más allá del esfínter rectal, evitando el contacto directo con materia fecal en el recto. Estos hisopados deben inocularse de inmediato en medios de cultivo o colocarse en un sistema de transporte adecuado para impedir el desecamiento.

Las muestras fecales deben examinarse y cultivarse lo antes posible después de la recolección.

A medida que la muestra fecal se enfría, la caída del pH rápidamente llega a ser suficiente para inhibir el crecimiento de muchas especies de *Shigella* y algunas especies de *Salmonella*.

El examen microscópico directo de un frotis teñido o emulsión fecal para evaluar la presencia de leucocitos, sangre y moco, levaduras; puede ser valioso en el diagnóstico diferencial de ciertas infecciones entéricas. Puede prepararse una emulsión de materia fecal en caldo de soya tripticaseína y examinarse directamente con el microscopio en un montaje húmedo, o pueden prepararse frotis fecales. Las heces deben diluirse en caldo solución fisiológica antes de preparar un frotis.

Si se sospecha que va a haber una demora en el procesamiento o si la muestra va a enviarse a un laboratorio alejado, debe usarse un conservador adecuado, pueden ser cantidades iguales de fosfato de sodio o potasio 0.033 molar y glicerol para recuperar bacterias patógenas, se aconseja la fijación con alcohol polivinílico, para frotis.

Los principales agentes etiológicos de problemas gastroentéricos son diferentes grupos de *E. Coli* (ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, EAEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Vibrio* (esta bacteria se verá en una práctica por separado).

OBJETIVOS DE UNIDAD

Que se aislen e identifiquen las bacterias que ocasionan infecciones en tracto digestivo, **como** por medio de una buena obtención de la muestra, aislamiento, tinciones, pruebas bioquímicas primarias y secundarias, sensibilidad a los antimicrobianos, **para** conocer el agente causal de la enfermedad.

OBJETIVOS DE OPERACION

1. **Que** se obtenga una buena muestra de heces, **como**, (directa, con hisopo rectal, biopsia histica) al inicio del cuadro clínico y sin haber sido tratado con antibióticos **para** obtener un buen resultado en el trabajo de la muestra.
2. **Que** se siembre la muestra, **como**, en medios de cultivo de Agar Mac Conkey, Xilosa-lisina-desoxicolato, Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Verde Brillante, **para** observar o no un crecimiento de la posible bacteria involucrada en el problema.
3. **Que** se utilicen caldos de enriquecimiento (tetrionato de sodio o selenito), **como**, inoculando un hisopo en el medio e incubándolo por una hora, posteriormente retirar el hisopo y continuar la incubación por un periodo de 18-24 horas, y, resembrar en los medios de Sulfito Bismuto y Verde Brillante, **para** observar la posible presencia del género *Salmonella*.
4. **Que** se seleccionen las bacterias sospechosas (descartando flora normal) **como** sembrando en los medios de SIM y KIA, **para** posteriormente realizar pruebas bioquímicas primarias y secundarias para identificar el género y la especie.
5. **Que** se lleven a cabo pruebas especiales (serología), **como**, con la ayuda de antígenos específicos **para** corroborar la presencia de serotipos específicos de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*.

MATERIAL**Medios de cultivo en caja.**

No. cajas x eq.

Agar Mac Conkey	2
Agar Xilosa-lisina-desoxicolato	2
Agar Salmonella Shiguelia	2
Agar sulfito bismuto	1
Agar verde brillante	2
Agar soya tripticaseína	2
DNAasa	1

Medios de cultivo en tubo.

No. tub. x eq.

Caldo tetrionato	1
Caldo selenito	1
Oxido-fermentación de glucosa l	
Urea	2
Citrato	2
Caldo nutritivo	2
Malonatos	2
SIM	2
TSI o KIA	2
Rojo de metilo	2
Vogues proskauer	2
Nitratos	2
Arginina, lisina, Ornitina	2
Fenilalanina	2

Carbohidratos al 1% en medio base rojo de fenol: inositol, sorbitol, adonitol, rafinosa, celobiosa, arabinosa, ramnosa, salicina, xilosa, maltosa, manosa, manitol, galactosa, lactosa, trealosa, (Dos tubos por equipo y 10 tubos por grupo de cada uno) .

Reactivos:

Aceite mineral estéril
 Aceite de inmersión
 Agua destilada estéril
 Rojo de fenol
 Reactivo de Ehrlich o Kovac's
 Rojo de metilo
 Alfa naftol 5%
 Hidróxido de potasio 40%
 Azul de metileno
 Peróxido de hidrógeno 30%
 Cristal violeta
 Lugol
 Safranina
 Alcohol acetona
 N-N-N-N- tetrametilparafenilendiamina
 Acido clorhídrico diluido
 Cloruro férrico
 Alfa naftilamina
 Acido sulfanilico
 Suero para grupos de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*
 Solución salina fisiológica al 85%, tubos con 1 ml.

Otros

Asa bacteriológica
 Cubre objetos
 Porta objetos
 Cubre boca
 Plastilina
 Mecheros
 Pinzas de disección
 Palillos estériles
 Papel filtro estéril

Equipo

Estufa
 Baño maría
 Microscopio óptico
 Microscopio estereoscópico

TÉCNICA

Sembrado: Colocar una impronta de la muestra en cada una de las placas a utilizar y posteriormente estriar diluyendo con el asa, incubar 24 hrs/37°C.

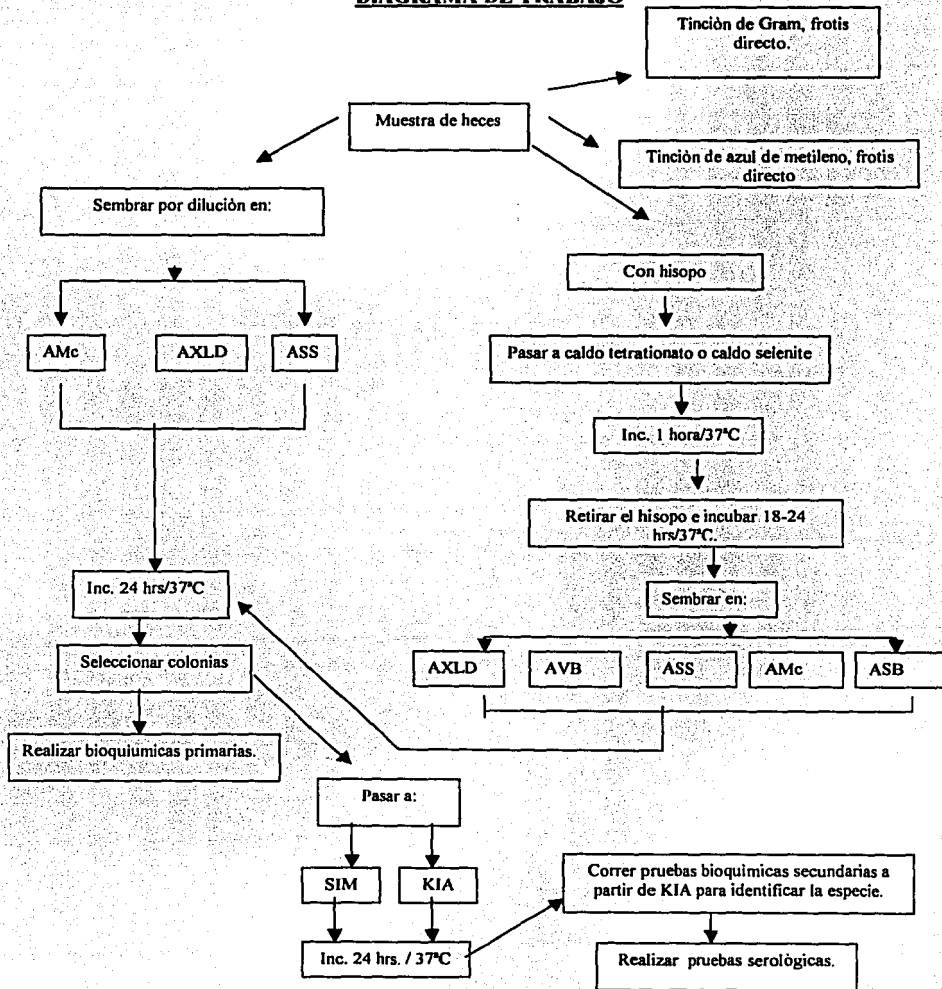
Interpretación: Seleccionar colonias: De acuerdo a sus características de crecimiento en los medios:

Medio de cultivo	Cambios en el medio	Interpretación
AXLD	Col. Blancas, cambia el medio a Amarillo.	Xil(+) Lis(-)
	Col. Blancas(cambia el medio a amarillo) y después se tornan Rojas(cambio del medio a rosa).	Xil (+) (Lis (+)
AVB	Colonias amarillas	Lac (+)
	Colonias rojas	Lac (-)
ASS	Col. Blancas con punto negro en El centro	Género <i>Salmonella</i>
	Col. Blancas	Género <i>Shigella</i>
ASB	Col. Negras con brillo metálico	<i>Salmonella thypi</i>
	Col. Negras sin brillo metálico	<i>Salmonella enteritidis</i>
	Col. verdes	<i>Salmonella spp.</i>
Amc	Col. Rosas (mediose torna rojo)	Lac (+)
	Col. Blancas (medio amarillo)	Lac (-)

Serología: Colocar una gota de suero para (*Shigella*, *Salmonella* o *E. coli*), sobre un porta objetos. Tomar una asada de la colonia a probar y homogenizar. Observar la presencia de grumos (aglutinación) y dar como resultado (+).

Pruebas bioquímicas a partir de KIA: Secorren las siguientes: Gram, catalasa, oxidasa, motilidad O/F, MR-VP, indol, arginina, lisina, ornitina, , nitratos, carbohidratos.

DIAGRAMA DE TRABAJO



HOJA DE RESULTADOS**COPROCULTIVO.**

EQUIPO.

ECHA:

PRUEBAS REALIZADAS	M.O. PROB. 1	M.O. PROB. 2
INDOL		
ROJO DE METILO		
VOGUES PROSKAUER		
CITRATOS		
AC.-SULFHIDRICO		
UREA		
FENILALANINA		
LISINA		
ARGININA		
ORNITINA		
MOTILIDAD		
MALONATOS		
OXIDO/FERMENTACION		
LACTOSA		
MANITOL		
SALICINA		
NITRATOS		
ADONITOL		
INOSITOL		
SORBITOL		
ARABINOSA		
RAFINOSA		
RAMNOSA		
MALTOSA		
XILOSA		
TREALOSA		
CELOBIOSA		
DNAasa		
NITRATOS		
OXIDASA		
MANOSA		
CATALASA		
GALACTOSA		

M.o. identificado:

BIBLIOGRAFIA

1. Cardefioso L. Patógenos Transmitidos por via fecal-oral. Sociedad Argentina de Pediatría. 2000. Buenos Aires, Argentina.
2. Johnny W. Peterson. Comparison of the Mechanisms of Action of Cholerae Toxin and the Heat-Stable Enterotoxins of E.coli. Infection and Immunity. April. 1995. Vol. 63. No. 4. Pp 1452-1461.
3. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 3º. Edición. 1992. España.
4. López Brea M. Gastroenteritis Bacterianas, Viricas, Parasitarias y Toxiinfecciones alimentarias. 1994. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Salamanca, España.
5. Microbiology for Health Sciences. Edit. J.B. Lippincott Company. 4º. Edición. 1992. Phyladelphia, Pennsylvania. Pp 172-335.
6. Stainer Roger Y. Microbiología. 2ª. Edición. Editorial Reverté, S.A. México, D.F. 1996. pp 17-190.
7. Tórtora-Funke-Case. Microbiology An Introduction. Edit. Benjamin/Cummings Publishing Company. 6º. Edición. 1997. Menlo Park, Cal. Pp 603-710

DIAGNOSTICO DE *Vibrio cholerae*.

Introducción:

Las especies de *Vibrio* tienen importancia histórica y contemporánea. *Vibrio cholerae* 0:1 agente etiológico del cólera asiático en humanos, produce una enfermedad diarreica potencialmente grave. El microorganismo fue descrito y designado con un nombre por primera vez, por Pacini en 1854, 32 años más tarde, Koch lo aisló y lo denominó *Kommabacillus* debido al característico aspecto curvo o con forma de coma de las células bacterianas^(5,7)

Al comentar el enfoque de laboratorio del aislamiento de *Vibrio* de muestras clínicas, Farmer y colaboradores sugieren 4 enfoques siguientes:

1. Usar procedimientos estándares y no hacer esfuerzos específicos en la búsqueda de especies de *Vibrio*.
2. Emplear procedimientos y medios de cultivo adecuados y buscar colonias oxidasa-positivas.
3. Incorporar agar.-tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) como una placa extra para cultivo de materia fecal.
4. Utilizar otros procedimientos especiales para aumentar el aislamiento de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* y otras especies de *vibrio*^(2,3,4)

Microscópicamente, se observan bacilos Gram (-) rectos o curvos. El aspecto de las células puede verse mejor durante la fase estacionaria temprana de cultivos en caldo, durante la fase exponencial o log, se mezclan formas cocoides redondeadas y rectas. Si es posible determinar un diagnóstico presuntivo de cólera al descubrir gran número de bacilos curvos con tinción de Gram directa de muestras fecales, es necesaria la recuperación del microorganismo en cultivo para efectuar una identificación definitiva, por pruebas que detectan a *Vibrio cholerae* 01(El Tor, Clásico).^(1,4,5,7)

Toma de muestra:

Las muestras deben tomarse lo antes posible durante el curso de la enfermedad.

En los periodos diarréicos agudos, pueden recogerse muestras del recto con una sonda de goma blanda o un hisopo, o de una pequeña porción de las heces líquidas. Es posible que el cultivo de material de vómitos también revele microorganismos, en particular en los estadios tempranos de la enfermedad.

Las muestras deben transportarse en envases cerrados para conservar la humedad y colocarse en medios de cultivo lo antes posible. Las especies de *Vibrio* en general son bastante sensibles a la desecación, exposición a la luz solar, y cambios extremos de pH. También son inhibidos con facilidad por la flora normal de intestino o microorganismos contaminantes. Si no es posible hacer cultivos de inmediato las especies de vibrio pueden permanecer viables en el medio de transporte semisólido de Cary-Blair durante un lapso prolongado (3 horas).

Debe evitarse el empleo de medio de transporte con solución salina y glicerol amortiguado. Si no se dispone de un medio de transporte puede emplearse una pequeña tira de papel secante grueso en la muestra fecal, colocarse en una bolsa de plástico sellado y enviarse al laboratorio más cercano.

Los caldos de enriquecimiento con agua peptonada pH= 9 deben subcultivarse en agar TCBS para una mayor evaluación de colonias que crecen más de 24-48 horas después de incubación.

OBJETIVO DE UNIDAD

Que se realice un buen análisis de la muestra (heces, vómito, agua) e investigación del microorganismo problema, *como*, por medio de la utilización de medios de cultivo selectivos y pruebas específicas, *para* identificar el agente causal del cólera humano.

OBJETIVOS DE OPERACION

1. *Que* se haga un buen manejo de la muestra proporcionada, *como*, tomando las medidas pertinentes (utilización de guantes, cubre boca, no flamear el asa, utilizar hipoclorito de sodio para desinfectar el asa) evitando una contaminación, *para* llegar a un buen diagnóstico.
2. *Que* se recupere la bacteria, *como*, sembrando en medio de enriquecimiento (agua peptonada pH= 9) y resembrar después de 6 horas de incubación en medio TCBS Y BAB *para* posteriormente identificar el género y la especie.
3. *Que* se identifique la especie bacteriana, *como*, con pruebas bioquímicas secundarias y especiales *para* obtener el género y la especie.
4. *Que* se determine el serotipo 01, el biotipo y los serotipos (Ogawa, Inaba e Hikojima), *como*, con los sueros polivalentes y monovalentes, *para* tener el serotipo específico y responsable del problema.

MATERIAL.**Medios de cultivo en cajas**

No. cajas x eq.

Agar (TCBS)	2
Agar soya tripticaseína	1

Medios de cultivo en tubo

SIM	1
Rojo de metilo	1
Voges Proskauer	1
Lisina , arginina, ornitina	1 c/u
Citratos	1
CST con triptofano	1
Agua peptonada pH=9	1

Material biológico

Muestras de heces o vómito del paciente con sospecha de cólera.

Cepa de Vibrio cholerae serotipo ELTOR y Clásico

Sangre de carnero para realizar las suspensiones de glóbulos rojos al 10% y 1%

Reactivos.

Aceite mineral estéril

Aceite de inmersión

Agua destilada estéril

Reactivo de Ehrlich o Kovacs

Solución salina fisiológica 0.85% 40 ml.

Desoxicolato de sodio

Polimixina B

Antisueros para serología (polivalente y monovalente = Inaba, Ogawa).

Rojo de metilo

Alfa naftol 5%

KOH

Acido sulfanilico

N-N-N-N-tetrametil-para-fenilendiamina

Peróxido de hidrógeno 30%

Cristal violeta

Safranina

Lugol

Alcohol acetona

Hipoclorito de sodio

Otros.

Asa bacteriológica

Cubre objetos

Porta objetos

Cubre bocas

Guantes

Plastilina

Mecheros

Pinzas de disección

Palillos estériles

Papel filtro estéril

10 pipetas de 1 ml estériles

10 pipetas de 5 ml. Estériles

10 vidrios de reloj

Papel estéri

Equipo

Estufa

Baño María

Autoclave

Microscopio óptico

Microscopio estereoscópico

Centrifuga

Balanza

TÉCNICA.

Hemaglutinación:

Se pueden emplear glóbulos rojos de pollo o de carnero, los acuaes se lavan 3 veces con PBS y la última vez con SSF. Se llevan a una concentración final de 2.5%.

1. Un portaobjetos limpio y desengrasado se divide en secciones con un marcador de tinta indeleble.
2. En cada sección se agrega una gota de los eritrocitos al 2.5%.
3. Se adiciona una gota de una suspensión de un cultivo joven hecho en solución salina de la cepa a probar debajo de la gota de glóbulos rojos, mezclar homogéneamente con el asa.
4. La aglutinación de los glóbulos rojos ocurre dentro de los primeros 30 segundos y en no más de un minuto en los casos positivos.

Hemaglutinación (+): Formación de grumos = *Vibrio cholerae* eltor

Hemaglutinación (-): No formación de grumos = *Vibrio cholerae* clasic

Hemólisis: en Tubo:

1. Sembrar la cepa en un tubo de 16 x 150 conteniendo 10 ml., de CN.
2. Incubar por 24 hrs /37°C. Tomar 0.5 ml., de este crecimiento y pasarlo a un tubo que contenga 0.5 ml., de glóbulos rojos de carnero al 1% previamente lavados tres veces.
3. Mezclar suavemente e incubar a 37°C por 2 horas y continuar con la incubación a 4°C toda la noche.
4. Al día siguiente buscar la hemólisis sin agitar los tubos.

Hemólisis (+): No formación de botón = *Vibrio cholerae* eltor.

Hemólisis (-): Formación de un botón = *Vibrio cholerae* clásico.

Sensibilidad a la polimixina B:

Se utiliza la técnica de Kirby-Bauer para probar la susceptibilidad de los aislamientos de *Vibrio cholerae*.

1. A partir de un cultivo en medio TSI, se siembra un tubo de CN, se incuba de 2 a 4 horas a 37°C, hasta igualar la turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

2. Con hisopo se siembra toda la superficie de polimixina B de 50 unidades. una placa de gelosa de Mueller-Hinton. Se coloca el disco
3. Incubar 18-24hrs/37°C.
4. Interpretar como sensibles las cepas que tengan halos de inhibición de cualquier diámetro.

Prueba del hilo mucoso:

Esta prueba se lleva a cabo en un portaobjetos, suspendiendo un inóculo de un cultivo de 18-24 horas en una gota de suspensión acuosa de desoxicolato de sodio 0.5%.

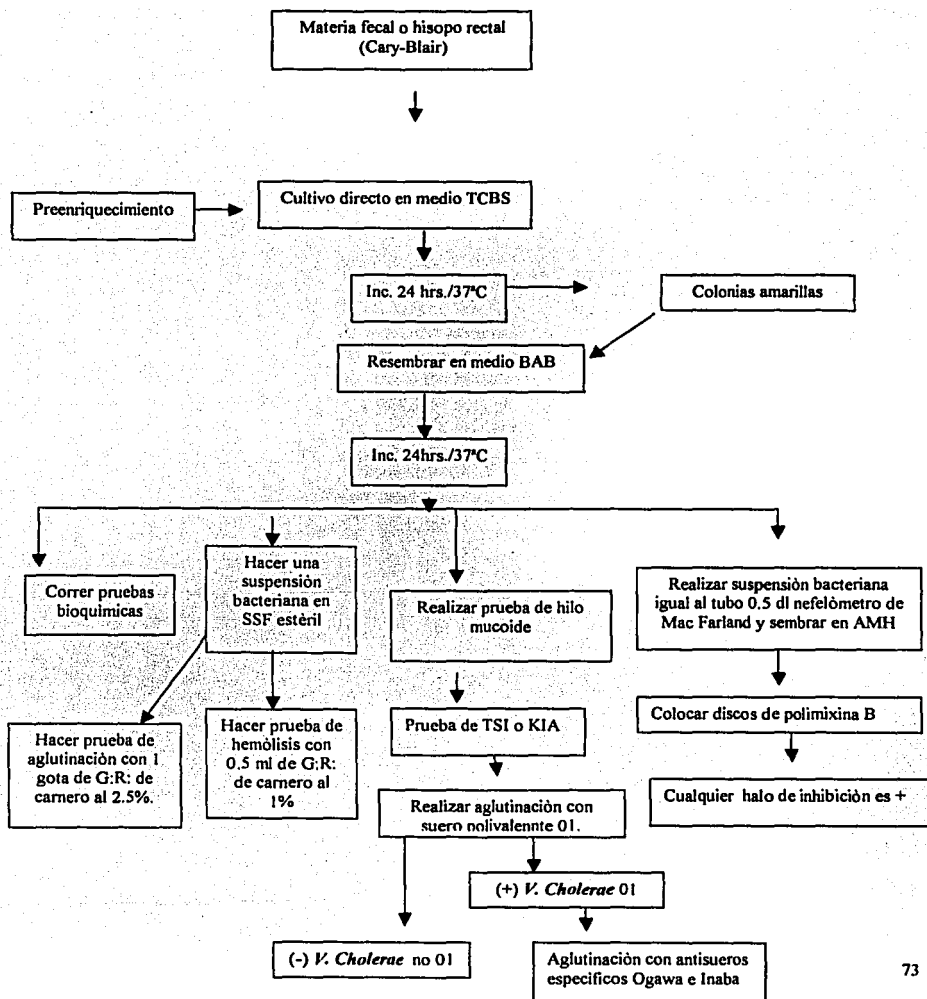
Cuando la reacción es positiva, como en el caso de los vibrios, la suspensión pierde inmediatamente su turbidez y adquiere una consistencia mucoide formándose un hilo mucoso que se observa al levantar y alejar el asa lentamente de la suspensión. Algunas cepas de *Aeromonas* pueden dar una reacción leve Retardada En unos 60 segundos



TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pruebas bioquímicas: Se corren las siguientes pruebas: Gram, catalasa, oxidasa, motilidad, O/F, KIA, MR-VP, indol, arginina, lisina, ornitina, sacarosa, manitol, nitrato.

Serología: Colocar una gota del suero a probar, y posteriormete colocar una asada de la muestra. Observar aglutinación.

DIAGRAMA DE TRABAJO

HOJA DE RESULTADOS**EQUIPO:****FECHA:**

PRUEBAS REALIZADAS			
Tinción de Gram			
Catalasa			
Oxidasa			
Motilidad			
Oxido – fermentación			
KIA			
Rojo de metilo			
Voges Proskauer			
Indol			
Arginina			
Lisina			
Ornitina			
Sacarosa			
Manitol			
Nitratos			
BIOTIPO	Hemólisis G.R. 1%	Aglutinación G.R. 2.5%	Polimixina B 50 U.I.
El Tor			
Clásico			

SEROGRUPO	Suero polivalente	Suero monovalente Inaba	Suero monovalente Ogawa
Inaba			
Ogawa			

***Buscar resultados en tablas**

BIBLIOGRAFIA

1. Cardeñoso L. Patógenos Transmitidos por vía fecal-Oral. Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires, Argentina. 1995. pp 22-37.
2. Carrada -Bravo. Teodoro. Pautas para el Diagnóstico y Tratamiento del Cólera. Avances y Perspectivas. Revisra de la Sociedad Mexicana de Pediatría, Marzo-Abril. 1995. Vol... 59 Num. 2. Pp 47-54.
3. David.K.R. The Sixth and Seventh Cholera Pandemics Are Due to Independent Clones Separately Derived from Environment.Non t.oxigenic, Non-01 *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology. June 1995. Vol. 177 No. 11. Pp 3191-3198.
4. Farmer, et.al. Diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Sociedad española de Pediatría. Mayo-junio. 1998. Vol. 30. Num. 1.pp 15-23.
5. Herwing Kollaritsh. Safety and Immunogenicity of Live Oral Cholera and Typhoid Vaccines, or Yellow Fever Vaccine. The Journal of Infections Diseases. September. 1997..... pp 871-875.
6. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 3ª. Edición. 1992.
7. López Brea M. Gastroenteritis Bacterianas, Viricas y Toxiinfecciones alimentarias. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y microbiología Clínica. 1996. Salamanca, España.
8. Rupak K. Bhadra. Cholera Toxin (CTX) Genetic Element in *Vibrio cholerae* 0139. Microbiology. 1995. Great Britain.. pp 1983-1997.

UROCULTIVO

Introducción:

El aparato urinario se divide por su disposición en vías urinarias en región alta (riñones, pelvis renales y uréteres) y bajas (vejiga y uretra). Las infecciones urinarias altas más comunes son ascendentes, es decir, se originan en la vejiga y ascienden a través de los uréteres hacia los riñones. Normalmente las válvulas vesicouretrales impiden el reflujo de orina desde la vejiga hacia los uréteres ⁽⁴⁾

La infección de las vías urinarias es una causa importante de consulta pediátrica y una entidad que genera controversias entre las diferentes especialidades clínicas que confrontan a pacientes con esta enfermedad. La prevalencia varía de acuerdo a diferentes áreas geográficas. Pero se acepta que de 1 a 3% de niñas y de 0.5 a 1% de varones presentarán por lo menos un episodio de infección urinaria durante la edad pediátrica. Estas cifras son aún mayores en centros hospitalarios de referencia, pero no reflejan la verdadera incidencia a nivel de la población general ^(1,7,9)

Las personas con anomalías urogenitales, sobredistensión de la vejiga por obstrucción del eflujo o mal funcionamiento neurogénico y las mujeres con sobredistensión del útero durante el embarazo son particularmente susceptibles a infecciones urinarias ascendentes. Las infecciones de la pelvis renal (pielitis) y la pielonefritis crónica son las complicaciones más comunes (en cuyo caso los síntomas se presentan como dolor lumbar o abdominal localizado en los cuadrantes superiores, el cual generalmente se acompaña de síntomas de malestar general y fiebre.

No obstante, clínicamente es difícil o imposible determinar el sitio preciso de la infección ^(3,4,7,9)

El origen de contagio de la infección en el parénquima renal puede ser por vía ascendente, cuando la infección se origina en la uretra o en la vejiga, o por vía hematògena o linfática, cuando la infección se origina en focos distantes o por sepsis. Cuando la infección se origina por vía ascendente los síntomas son de vías urinarias bajas como: dolor o ardor para orinar (disuria), frecuencia urinaria (polaquiuria) y sensación de vejiga llena (tenesma vesical). ^(1,5,6)

Muchas infecciones urinarias bajas en el hombre comprometen la vejiga y en algunos casos se diseminan hacia la próstata y la uretra. La micción frecuente y dolorosa de pequeñas cantidades de orina turbia, así como una sensación de pesadez o dolor suprapúbico, son las manifestaciones clínicas usuales.

Las manifestaciones clínicas cardinales de las infecciones urinarias altas son fiebre (a menudo con escalofríos) y dolor en la zona renal. La frecuencia, urgencia y disuria son más sugestivas de infecciones de la vejiga y uretra. Sin embargo algunos pacientes con pielonefritis y otras infecciones urinarias altas primero presentan síntomas más compatibles con infecciones urinarias bajas.

Los gerontes pueden sufrir infecciones urinarias asintomáticas que se reconocen solo porque la orina puede parecer turbia o porque se observan neutrófilos segmentados y altas concentraciones de bacterias en exámenes microscópicos^(2,4,7,9)

Excepto por la mucosa uretral, que permite el crecimiento de una microflora, las vías urinarias normales habituales están desprovistas de bacterias., dado que la uretra masculina y el área periuretral femenina alojan microorganismos, la orina puede contaminarse fácilmente con bacterias de la vagina o el perineo^(4,6)

La infección de vías urinarias se define como la invasión bacteriana de tejidos que conforman las estructuras urinarias a cualquier nivel. La presencia de bacterias en orina se denomina bacteriuria y su detección es a través del urocultivo.

La presencia de leucocitos en el sedimento urinario, también llamada piuria, aunque sugerente, no suplanta a la bacteriuria para determinar la existencia de la infección urinaria. Lo mismo sucede con la observación de bacterias en el sedimento urinario.

Los cultivos de orina con recuentos semicuantitativos de colonias continúan siendo la base para el diagnóstico de infecciones urinarias. Un recuento de más de 10^5 UFC/ml., es indicativo de infección, mientras que el crecimiento menor a 100 UFC/ml., se considera negativo. Antes de iniciar la terapia, se recomienda realizar y determinar la sensibilidad a antibióticos^(2,4,6,7,9)

Alrededor de 900,000 casos anuales son de origen nosocomial. Probablemente el 90% de estos son asociados con catéteres urinarios. Más de la mitad de infecciones nosocomiales del tracto urinario son causadas por *E. coli*. También son comunes las infecciones por *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*.

Generalmente las IVU son ocasionadas por una sola bacteria, existen pocos casos en donde se involucran más de una bacteria. ^(4,6,9)

Toma de muestra:

Las muestras de orina generalmente se obtienen por medio de la técnica de recolección limpia. La obtención de orina de mujeres por medio de ésta técnica requiere una supervisión personal para mejores resultados. Primero se limpia el área periuretral y el perineo con 2 ó 3 compresas de gasa saturadas con agua y jabón, usando un movimiento de adelante hacia atrás, y luego se enjuaga con solución fisiológica o agua, ambas estériles. Los labios mayores deben mantenerse separados durante la micción y dejar salir, sin recoger, los primeros mililitros de orina para disminuir la contaminación por bacterias de la uretra. Luego se recoge la parte media del chorro de orina en un envase estéril de boca ancha, que puede cerrarse con una tapa bien ajustada. En hombres, habitualmente el agua jabonosa no es necesaria; por lo general, la simple limpieza del meato urinario inmediatamente antes de la micción y la recolección de la parte media del chorro son suficientes.

Pueden usarse otras 2 técnicas en casos especiales: sondeo y aspiración suprapúbica.

La aspiración suprapúbica (la cual es tomada por el médico) se reserva casi exclusivamente para neonatos y niños pequeños o en ocasiones, para adultos en quienes se sospecha una infección urinaria, pero cuya muestra de orina recolectada con la técnica limpia no ha permitido establecer un diagnóstico, si empleamos la bolsa estéril disponibles en el mercado.

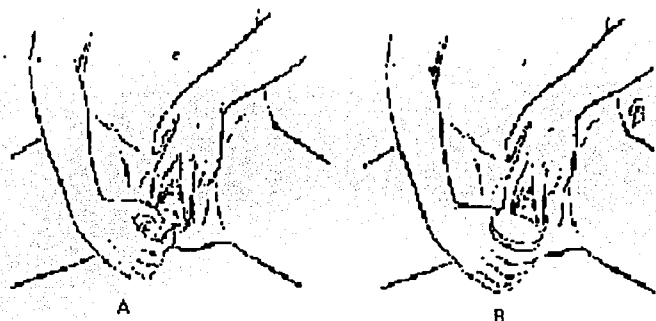
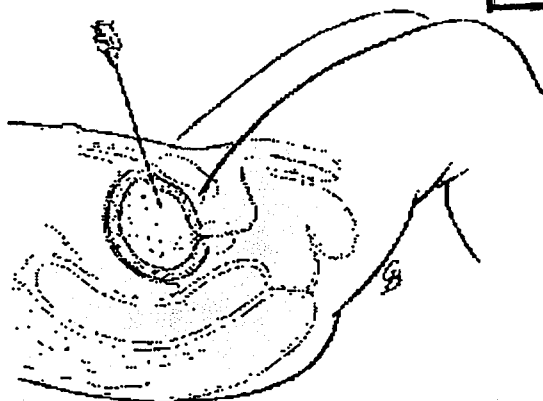
FIGURA No. 3.**TOMA DE MUESTRA DE VIAS URINARIAS PARA UROCULTIVO. TÉCNICA LIMPIA**

Fig. 3.- Recolección de orina con técnica limpia de la parte media del chorro (A). Se separan los labios mayores con los dedos y se limpia la zona con una compresa de gasa 4x4 saturada con jabón verde. La parte media del chorro de orina se recoge en un envase estéril (B).

FIGURA No. 4**TOMA DE MUESTRA DE VIAS URINARIAS PARA UROCULTIVO**
ASPIRACIÓN SUPRAPUBICA**TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Toma de muestra de orina para cultivo. Aspiración Vesical suprapúbica. Se dirige una aguja perpendicularmente hacia la vejiga, justo por encima de la sínfisis púbica. La orina puede extraerse con una jeringa.

OBJETIVOS DE UNIDAD

Que se aislen e identifiquen las bacterias que ocasionan infecciones en tracto urinario, como, por medio de una buena obtención de la muestra, aislamiento, pruebas bioquímicas primarias y secundarias, así como sensibilidad a los antimicrobianos, para conocer el agente causal de la enfermedad y sugerir un tratamiento.

OBJETIVOS DE OPERACION

1. *Que se obtenga una buena muestra de orina, como, por (recolección limpia, sondeo o aspiración suprapúbica) al inicio del cuadro clínico y sin haber sido tratado con antibióticos, para obtener un buen resultado.*
2. *Que se realice una cuenta viable, y se determine la cantidad de bacterias por ml., como, sembrando una gota de orina(con asa calibrada 0.01 ó 0.001 ml) en las cajas de medio (AS, Mc, SM, Biggy) en forma masiva e incubando a 37°C/24 hrs., para llevar a cabo el conteo de UFC en cada placa.*
3. *Que se aislen las bacterias sospechosas (descartando flora normal) e identificar el género y la especie bacteriana como, por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias, (LOA, urea, IMVIC, CHOs) para dar un resultado en género y especie.*
4. *Que se realice prueba de sensibilidad a los antimicrobianos a la bacteria identificada, como, por la técnica de Kirby Bauer o MIC, para sugerir un tratamiento.*

MATERIAL**Medios de cultivo en caja**

Por equipo

Agar sangre	1
Agar Mac Conkey	1
Agar sales manitol	1
Agar Biggy o SDA	1
Agar Muller Hinton	1

Medios de cultivo en tubo

Por equipo

Medio malonatos	1
Medio O/F	2
Medio urea Christensen	1
Caldo nutritivo	1
Citratos	1
SIM	1
Nitratos	1
Rojo de metilo	1
Vogues Proskauer	1
KIA o TSI	1
Lisina, ornitina, arginina	1 c/u

De las siguientes pruebas se utilizan 10 tubos por grupo y un tubo por equipo de cada uno en medio rojo de fenol al 1%: gelatina, maltosa, xilosa, salicina, esculina, fenilalanina, sorbiol, manitol, inositol, adonitol, rafinosa, arabinosa, ramnosa lactosa.

Reactivos

Aceite mineral estéril

Aceite de inmersión

Agua destilada estéril

Tubos de dilución con 4.5 ml de solución salina fisiológica

Reactivo de Erlich o Kovac's

Rojo de metilo

N-N-tetrametilparafenilendiamina

Peróxido de hidrógeno 30%

Cristal violeta

Lugol

Alcohol acetona

Safranina

Alfa naftol 5%

Hidróxido de potasio 40%

Otros .**Para G(+)**

Discos de cefalotina

Discos de eritromicina

Discos de amikacina

Discos de sulfametoxazol-trimetoprim

Discos de Amoxicilina-Ac. Clavulánico

Discos de ampicilina

Para G(-)

Discos de gentamicina

Discos de ceftazidima

Discos de nitrofurantoina

Discos de ac. Nalidixico
Discos de cefotaxima
Discos de sulfametoxazol-trimetoprim
Discos de Amikacina
Discos de Ciprofloxacina
Asa bacteriológica
Hisopos estériles
Porta objetos
Cubre objetos
Mecheros
Pinzas de disección
Palillos estériles
Papel filtro estéril
Papel estéril (absorbente)
Pipetas de 1 ml. estériles
Pipetas de 5 ml. estériles
Tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Equipo

Estufa
Baño maría
Microscopio óptico
Microscopio estereoscópico
Balanza
Centrífuga
Tubos de ensaye estériles

Material biológico

angre de carnero 5%
Suero descomplementado
Plasma

TÉCNICA**Frotis directo:**

Centrifugar 3 ml., de orina y con el sedimento hacer un frotis y teñir con Gram.

Gota suspendida: Con la orina original se realiza gota suspendida y se observa al microscopio para ver la carga bacteriana y determinar si se realizan diluciones.

Sembrado:

Con asa calibrada colocar 0.01 ó 0.001 ml., en el centro de cada una de las placas (AS, AMc, ASM, Abi) y sembrar en forma radial o en 3 direcciones (en toda la superficie de los medios).

Diluciones:

A partir de la orina concentrada realizar diluciones decimales en SSF estéril (4.5 ó 9 ml), dependiendo de la carga bacteriana que se observe en la gota suspendida y en el frotis directo las diluciones pueden ir desde 10^{-1} hasta 10^{-5} .

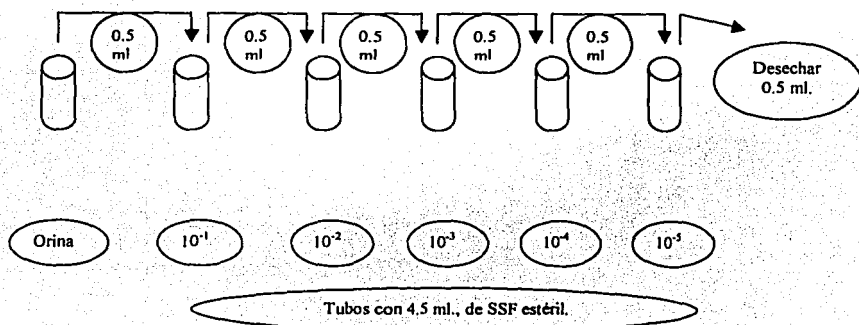
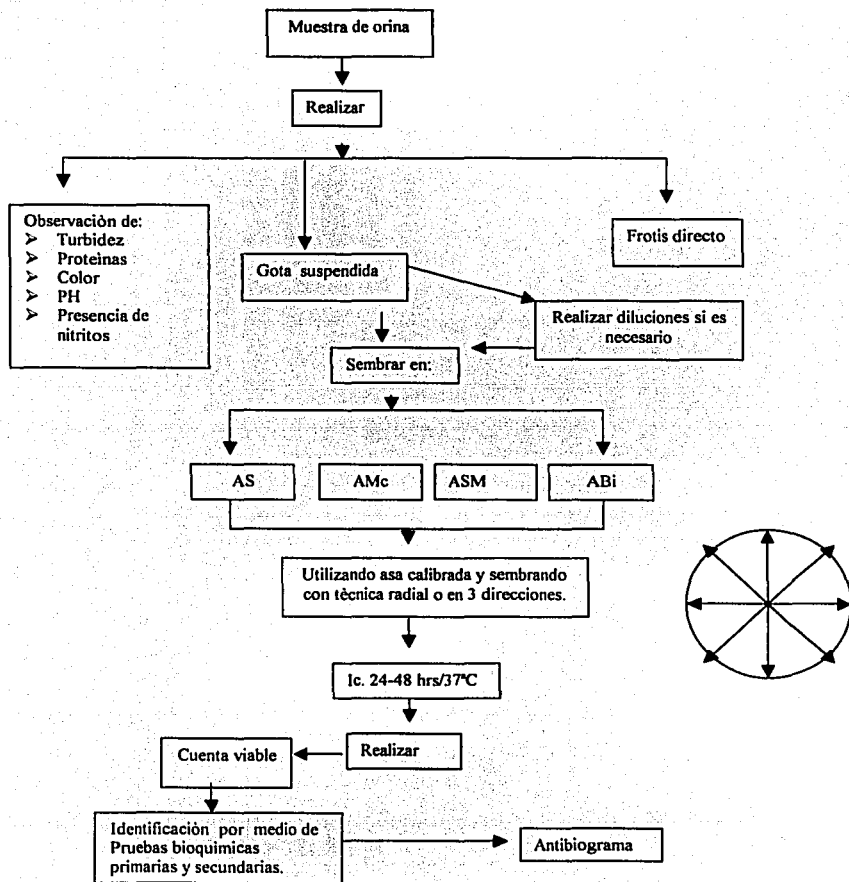
REALIZACIÓN DE DILUCIONES

DIAGRAMA DE TRABAJO



HOJA. DE RESULTADOS**EQUIPO****FECHA.**

PRUEBAS REALIZADAS	M.O. PROB. 1	M.O. PROB. 2
Indol		
Rojo de metilo		
Voges Proskauer		
Citratos		
TSI ó KIA		
Ac. Sulfhídrico		
Urea		
φ-alanina		
Lisina		
Arginina		
Ornitina		
Motilidad		
Gelatina		
Malonatos		
Oxido/fermentación		
Lactosa		
Manitol		
Salicina		
Adonitol		
Inositol		
Sorbitol		
Arabinosa		
Rafinosa		
Ramnosa		
Maltosa		
Xilosa		
Esculina		
Nitratos		
Oxidasa		
Catalasa		
Gram		
Coagulasa		

Ufc/ml.

M.o. identificado:

**HOJA DE RESULTADOS
ANTIBIOGRAMA**

SENSIDISCO	S (SENSIBLE)	R (RESISTENTE)	I (INTERMEDIO)
Cefalotina			
Amikacina			
Gentamicina			
Acido nalidixico			
Sulfametoxazol - trimetoprim			
Nitrofurantoina			
Ceftazidima			
Clindamicina			
Ampicilina			
Cefotaxima			
Amoxicilina-ac. clavulánico			

BIBLIOGRAFÍA

1. Coghlan A. Blessed relief: A simple jab could save women from an irritating infection. New Scientist. 1999. February 13. 161-167.
2. Gary A. Noskin. Infecciones complicadas de las vias urinarias. Atención médica. Noviembre 1997. Pp 60-67.
3. Keith B. Armitage. Infecciones recurrentes de las vias urinarias. temas sobre salud femenina. Atención médica. Febrero 2000. México, D.F pp 11-28
4. Kóneman. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 3ª. edición. 1992. España Park, Calif. Pp 603-710
5. Microbiology for the Health sciences. Edit. J.B. Lippincot Company. 4ª. Edición. 1992. Philadelphia, Pemsylvania. Pp 329-335.
6. Muñoz Arispe Ricardo. Infección de Vias urinarias. Revista mexicana de puericultura y pediatría. Vol. 6 Num. 27. Enero-febrero. 1998. México, D.F. pp 12-17.
7. Ronald A. Sex and urinary tract infections. Edit. N. Engl J. Med. 1996. Pp 335, 511-512
8. Rubin R. Urinary tract infection pyelonephritis and reflux nephropathy. The kidney, Brenner MB, Phyladelphia, WB Saunders Co. 1996. Pp 1597-1599.
9. Tórtora-Funke-Case. Microbiology an Introduction. Edit. Benjamin/Cummings publishing company. 6ª. Edición. 1997. Menlo Park Calif. Pp 603-710.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS. API 20-E

Introducción:

El concepto de combinar una serie de medios o sustratos diferenciales en un solo envase, seleccionados para ayudar a identificar miembros de un grupo de bacterias, es un buen logro. De hecho, la disponibilidad de sistemas de caracterización en equipos evolucionó naturalmente, casi como una necesidad práctica. Los m.o., que hoy se sabe que causan enfermedades infecciosas no sólo son muchos, sino que a menudo son exigentes y requieren una amplia batería de pruebas bioquímicas para su estudio.⁽⁴⁾

La microbiología clínica, se ha visto beneficiada tardíamente de los avances tecnológicos que han tenido una influencia tan positiva en otras áreas de la medicina en cuanto a experimentación en el laboratorio. No habría sido inusual entrar en un laboratorio de bacteriología clínica a fines de la década de 1960 para comprobar el poco cambio que ha habido en cuanto a detección e identificación en los casi 80 años desde la utilización original del agar por Koch. En la transición de las metodologías clásicas a las contemporáneas llevadas a cabo para la identificación de especies patógenas, el punto de referencia se ha desplazado desde las técnicas en múltiples etapas hasta las unitarias con énfasis en la estandarización, velocidad, miniaturización, mecanización y automatización^(3,5)

La comercialización de numerosos sistemas rápidos y mecanizados/automatizados para la detección microbiana ha aumentado la capacidad del laboratorio de microbiología clínica de proveer resultados rápidos y exactos. Además, podrían reducir los costos de laboratorio y el tiempo durante el cual un paciente permanece internado.

Existe una tendencia en las evaluaciones efectuadas por el laboratorio acerca de los sistemas de identificación comercial. Los primeros esfuerzos compararon el porcentaje de coincidencia de reacciones bioquímicas individuales frente a uno "estándar". Investigaciones posteriores, conscientes de que la estadística de coincidencia varía con la composición de los medios, compararon sólo resultados finales. La inconveniencia y el gasto de preparar una batería de medios especialmente formulados, como los usados por los institutos de referencia, por ejemplo los Centros de Control de

Enfermedades, han conducido a muchos conocedores del tema a comparar ahora la exactitud de un método con la de otro.

Está más allá de la capacidad de muchos laboratorios mantener la diversidad de medios convencionales necesarios. Estos kits instrumentales compactos (que requieren poco espacio para su almacenamiento), con reacciones químicas fácilmente visibles, larga vida útil y control de calidad estandarizado provisto por los fabricantes resultan muy convenientes para los laboratorios de microbiología. ^(1,4,5)

Son especialmente útiles en lugares en donde el área de trabajo es pequeña, y puede no contarse con el tiempo o la experiencia técnica requeridos para llevar a cabo muchas de estas identificaciones y además el control de calidad es más difícil de mantener.

Los sistemas se dividen en tres categorías principales: 1) Bioquímicos manuales para identificación microbiana, 2) Mecanizados/automatizado y 3) Inmunológicos.

En la actualidad, en muchos laboratorios clínicos es casi una práctica estándar usar uno o más sistemas instrumentales para la identificación de ciertos géneros y especies. ⁽²⁾

Las técnicas para los distintas pruebas tales como: bacterias, hongos y pruebas para susceptibilidad microbiana son también importantes y se realizan por éste método.

Pueden obtenerse tarjetas para la determinación de G(-) fermentadores y no fermentadores, levaduras, estafilococos y estreptococos, algunos de los cuales requieren un período de incubación más prolongado.

Estos sistemas instrumentales han hallado una amplia aceptación en los laboratorios clínicos por los siguientes motivos:

1. Varios poseen una larga vida útil 6-12 meses con lo cual se minimiza el problema de caducidad.
2. Requieren sólo un mínimo de espacio para almacenamiento e incubación.
3. Algunos son tanto o más fáciles de usar que los métodos convencionales.
4. La inoculación es simple.
5. Las reacciones en general son claras en 24 horas y la disponibilidad de archivos computerizados hace que la identificación final resulte sencilla y exacta ^(3,4,5)

OBJETIVOS DE UNIDAD

Que se lleve a cabo el diagnóstico rápido de una enterobacteria problema aislada, *como*, por medio de la utilización del sistema API 20E, *para* la identificación de la bacteria y poder compararlo con un sistema macro (bioquímicas en tubos de ensayo) y ver cómo se puede optimizar el material, trabajo y espacio en el laboratorio.

OBJETIVOS DE OPERACION

Que se mantenga una enterobacteria (identificada por sistema macro tubos de bioquímicas primarias y secundarias) obtenida en la práctica de coprocultivo y urocultivo y llevar a cabo el corrimiento del sistema API 20E *como*, resembrandola en medio nutritivo, *para* posteriormente identificarla por medio del sistema API 20E.

MATERIAL.**Medios de cultivo en caja**

Por equipo

AST

1

Pruebas bioquímicas (Kit API 20E) 1

ONPG, citratos, ácido sulfhídrico, triptofano deaminas (TDA), gelatina, glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina, arabinosa, indol, VP, oxidasa, nitratos, movilidad (MOB), crecimiento en medio Mc, OF.

Las siguientes pruebas del sistema requieren la adición de aceite mineral estéril.

Arginina

Lisina

Ornitina

ureasa

Reactivos:

Aceite mineral estéril

Agua destilada estéril

Cloruro férrico 10%

Reactivo de Ehrlich o Kovac's

Alfa naftol 5%

Hidróxido de potasio 40%

N-N-tetrametilparafenilendiamina

Cristal violeta

Acido sulfanílico

Alfa- naftilamina

Zinc en polvo

Lugol

Alcohol acetona

Safranina

SSF estéril

TÉCNICA

Preparación del sistema:

- Preparar una cámara de incubación con su tapa correspondiente y repartir 5 ml., de agua destilada o desmineralizada en los alveolos para proporcionar una atmósfera húmeda.
- Anotar la referencia de la cepa en la lengüeta lateral.
- Sacar el sistema de su empaque.
- Colocar todo el sistema en la cámara de incubación.
- Paralelamente, realizar la prueba de oxidasa tomando una colonia idéntica a la que será estudiada:
 - Colocar un trozo de papel filtro sobre un portaobjetos, y humedecerlo con agua.
 - Colocar la muestra y añadir una gota de reactivo para oxidasa.
 - Si la reacción es positiva aparecera en 1 ó 2 minutos una coloración púrpura.
 - El resultado de esta reacción deberá ser anotado ya que constituye la prueba No. 21 de la identificación.

Preparación del inóculo:

- Abrir un tubo con 5 ml de SSF estéril
- Colocar una colonia de la placa de aislamiento
- Realizar una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio.
- Igualar al tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Inoculación del sistema:

- Llenar tubos y cúpulas de las pruebas de Citratos, VP y gelatina con la suspensión bacteriana.
- Llenar los tubos pero no las cúpulas de las demás pruebas.
- Llenar la cúpula de las pruebas de arginina (ADH), lisina (LDC), ornitina (ODC), H₂S, urea (URE) con aceite mineral estéril para obtener anaerobiosis.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 37°C/18-24 hrs.

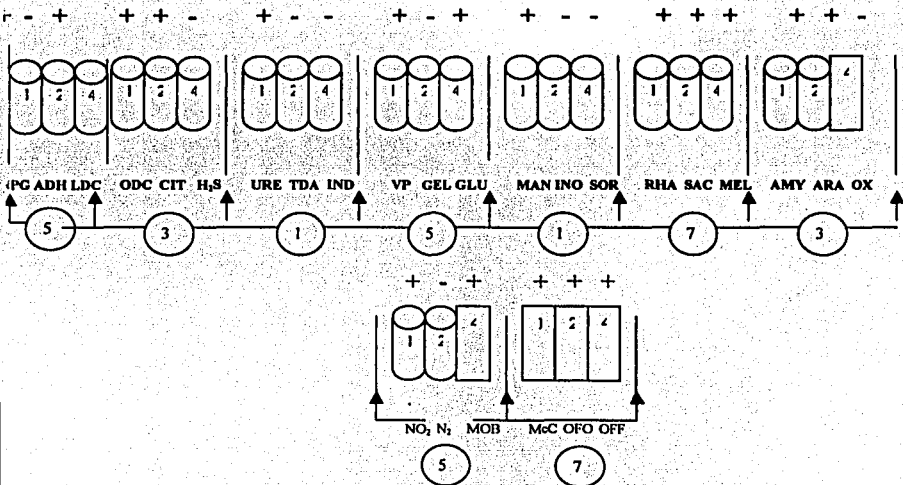
Lectura del sistema:

- Después de 18-24 horas a 37°C leer el sistema con la ayuda de la tabla de lectura.
- Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas.
- Si la glucosa es positiva y/o 3 o más pruebas son positivas, efectuar el revelado de las pruebas que requieran reactivos.
 - Prueba de TDA: Añadir una gota de reactivo TDA. Un color marrón oscuro indica una reacción positiva. Anotar los resultados.
 - Prueba de IND: Añadir 1 gota de reactivo de James, si la reacción es positiva aparecerá una coloración rosa. Anotar los resultados.
 - Prueba de VP: Añadir 1 gota de VP 1 y VP 2. Esperar como mínimo 10 minutos. Un color rojo o rosa indican una reacción positiva. Anotar los resultados.
 - Prueba de NO₂: Añadir 1 gota de NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 3 minutos. Un color rojo indica una reacción positiva. Una reacción negativa puede deberse a la reducción de los nitratos a N₂ (acompañada muchas veces de la formación de burbujas): añadir de 2 a 3 mg de reactivo de Zn. Si después de 5 minutos el tubo permanece amarillo indica una reacción positiva. Si la reacción da color rosa o rojo la reacción es negativa.

Identificación:

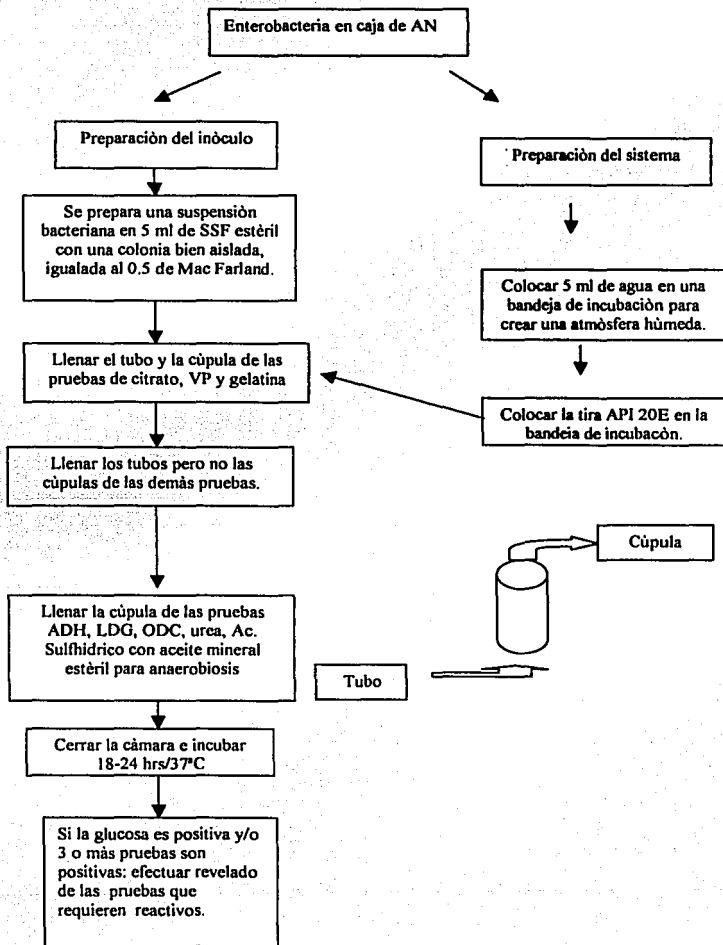
- Con el API 20-E Index: del conjunto de reacciones debe obtenerse un perfil numérico.
 - En la hoja de resultados las pruebas están en grupos de tres y cada uno tiene asignado un valor 1,2 ó 4. El sistema API 20-E consta de 20 pruebas, los números en el interior de cada grupo corresponden a las reacciones positivas. La prueba de la oxidasa es el No. 21 y si es positivo se le asigna el valor 4. Sumando los valores de las pruebas positivas para cada grupo se obtiene un código de 7 cifras.
 - El programa informático para identificación se utiliza introduciendo manualmente en el teclado el perfil numérico de 7 cifras.
 - En algunos casos, el perfil de 7 cifras no es suficiente para la identificación, debiendo realizarse las pruebas complementarias:
 - Reucción de los nitratos a nitrógeno (N₂), movilidad (MOB), Cultivo de MacConkey
- Reducción de nitratos a nitritos (NO₂), Oxidación de la glucosa (OF-O. Y fermentación (OF-F)

Ejemplo.

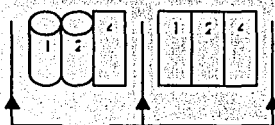
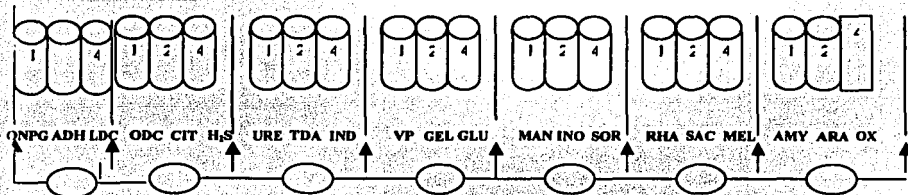


Nombre Del Microorganismo (género y especie).

Enterobacter gergoviae

DIAGRAMA DE TRABAJO

HOJA DE RESULTADOS.



NO₂ N₂ MOB McC OFO OFF



Nombre Del Microorganismo (género y especie).

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1997. Buenos Aires. Pp 148-301.
2. Balows Albert. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edición. Editorial American Society for Microbiology. 1998. Washington, D.C. pp. 61-62, 80-89, 115.
3. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. 3ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1996.
4. Lennette Edwin. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1997. Pp 128-145.
5. Young Daniel. Microbiología de alimentos. Univesidad del Estado de Kanzas, EE.UU. 2000. Pp1-8.

EXUDADO FARINGEO

Introducción:

Cada año, las infecciones en vías respiratorias, son causa de un gran número de visitas al médico y continúan siendo la principal motivo de morbilidad y mortalidad en todo el mundo⁽⁷⁾

El tracto respiratorio está formado por nariz, faringe (garganta), laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y alveolos.

La laringe normalmente está libre de microorganismos porque las mucosas de las membranas y el pulmón tienen mecanismos de defensa que eliminan eficientemente los invasores. De esta manera, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, especies de *Pseudomonas sp* y algunas levaduras encontradas en muestras de esputo indican algunas enfermedades infecciosas del pulmón o contaminación de las muestras por la flora normal del aparato respiratorio alto.

Las membranas de la parte alta del tracto, que incluyen la nasofaringe y la orofaringe proporcionan un ambiente conveniente para el crecimiento de muchas especies de *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Neisseria sp*, *Corynebacterium sp* levaduras y otros microorganismos.

En personas susceptibles muchos de estos oportunistas pueden causar enfermedades en el tracto respiratorio⁽⁹⁾

Cuando la laringe es el sitio de infección, se sufre de laringitis lo cual afecta la habilidad para hablar. Esta infección es causada por bacterias, tales como *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus pyogenes* y algunos virus, a menudo en combinación. Además de laringitis también pueden causar inflamación de tonsilas o tonsilitis^(4,5,7,10)

Cuando hay una reinfección por *Streptococcus pyogenes* o *Haemophilus influenzae*, las membranas mucosas vuelven a inflamarse y se tiene una descarga de moco nasal pesado. Estas enfermedades son casi siempre restrictivas personales, eso significa que puede ocurrir una recuperación regular sin intervención médica.

La epiglotitis puede causar la muerte en pocas horas y es provocada por patógenos oportunistas, usualmente *Haemophilus influenzae* tipo b.

La vacuna Hib tiene significado en la reducción de la incidencia de epiglotitis en la población vacunada.(3,4,5)

Infecciones serias como secuelas de una faringitis se tiene: sinusitis, otitis media, bronquitis y neumonía, son algunas de las enfermedades importantes a este nivel. (4,7,9)

La flora normal bacteriana establecida en las mucosas de la nariz y garganta incluye especies como: *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Haemophilus sp*, *Corynebacterium sp*, *Neisseria sp*, *Bacteroides sp*, *Branhamell sp*, *Fusobacterium sp*. Muchos de estos microorganismos pueden causar enfermedades oportunistas del tracto respiratorio.(9)

Los laboratorios deben estar preparados para manejar solicitudes de recuperación e identificación de especies bacterianas y de material faríngeo en casos de problemas encontrados menos habitualmente tales como *Bordetella pertusis*, *Corynebacterium diptheriae*(7)

Existen algunas secuelas que provocan las infecciones a este nivel como los son:

Otitis media, sinusitis, meningitis, fiebre reumática, glomérulo nefritis aguda, eritema nudoso, miocarditis.

Toma de muestra:

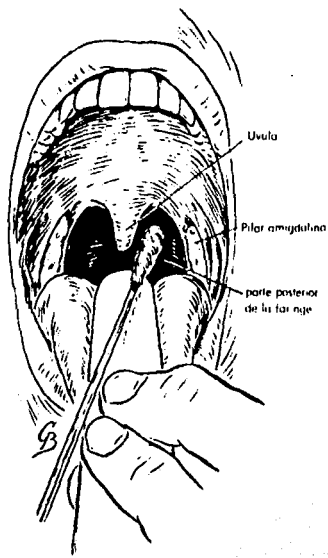
Las muestras se deben tomar al inicio del cuadro clínico y antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. Para que en el laboratorio se pueda tener un resultado confiable y útil la recolección de la muestra debe cumplir ciertas características.

Se inclina la cabeza del paciente hacia atrás y se ilumina bien la garganta.

Se instruye al paciente para que respire profundamente y se deprime la lengua con suavidad con un abatelenguas de modo que se pueda observar la parte posterior de la garganta, con el hisopo previamente humedecido en caldo nutritivo o SSF estéril (los *Streptococcus* se recuperan mejor si el hisopo está seco), se frota entre los pilares amigdalinos y detrás de la úvula hacia atrás y hacia delante a través de la parte posterior de la faringe para obtener una muestra adecuada teniéndose la precaución de no tocar las paredes de la cavidad bucal, dientes y lengua.

Una vez recogida la muestra, el hisopo debe colocarse de inmediato en un adecuado para el transporte al laboratorio como es el medio de Stuart; o sembrar directamente en los medios de cultivo. Si solo se desea recuperar *Streptococcus* beta-hemolítico del grupo A, pueden dejarse que los hisopos se sequen durante el transporte sin comprometer la recuperación de microorganismos viables. Algunos laboratorios incluso recomiendan colocar la punta del hisopo en un agente secante, como gel de sílice, para suprimir la supervivencia de comensales y permitir la recuperación de *Streptococcus* del grupo A, que no son inhibidos.

Muchos microbiólogos prefieren obtener dos hisopados faríngeos, uno para extracción de antígenos y el otro para cultivo en caso de que el procedimiento de detección directa resultara negativo.

FIGURA No. 5**TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL PARA CULTIVO DE GARGANTA**

Se pide al paciente que abra mucho la boca y que diga "ah". Se deprime suavemente la lengua con un abatelenguas y se guía un hisopo hacia la parte posterior de la faringe por encima de la lengua. Se pasa el hisopo con suavidad por la mucosa por detrás de la úvula y entre los pilares amigdalinos con movimiento hacia atrás y adelante.

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se aislen e identifiquen las bacterias que ocasionan problemas en vías respiratorias altas (garganta), **como**, por medio de una buena toma de muestra, cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas y determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos por medio de la técnica de MIC o Kirby Bauer, **para** conocer el agente etiológico y sugerir un tratamiento.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. **Que** se haga una buena toma de muestra de garganta, **como**, con la ayuda de un hisopo humedecido en caldo o solución salina fisiológica estéril y haciendo los movimientos adecuados en la parte seleccionada, (amígdalas, parte posterior de la úvula) **para**, llegar a obtener un buen diagnóstico.
2. **Que** se siembre la muestra, **como**, en medios de cultivo de Agar sangre, agar chocolate, sales manitol, Mac Conkey, ADS **para** observar o no un crecimiento de los posibles microorganismos involucrados en el problema.
3. **Que** se identifique el género y especie bacteriano **como**, por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias **para** dar un resultado de género y especie.
4. **Que** se realice prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, a la bacteria identificada **como**, por la técnica de Kirby Bawer, **para** sugerir un tratamiento.

MATERIAL**Medios de cultivo en caja**

No. cajas x equipo

Agar Sangre	3
Agar sales manitol	1
Agar chocolate	1
Agar Mac Conkey	1
Agar dextrosa sabouraud	1
Agar Muller – Hinton + sangre	1
Agar Muller- Hinton	1
Agar soya tripticaseína	1

Medios de cultivo en tubo

No.tub. x eq.

Bilis esculina	1
NaCl 6.5%	1
Urea	1
Caldo nutritivo	1
Oxido fermentación	2
Hidrólisis de hipurato	1
Nitratos	1

Carbohidratos en medio base rojo de fenol: Maltosa, trealosa, manitol, manosa, sacarosa, xilosa, rafinosa, (se utiliza 1 tubo por equipo y 10 tubos por grupo de cada uno)

Reactivos.

Agua destilada estéril
 Aceite mineral estéril
 Aceite de inmersión

Cloruro férrico
Alfa-naftilamina
Acido sulfanílico₂
N-N-tetrametilparafenilendiamina
Peróxido de hidrógeno 30%
Cristal violeta
Lugol
Alcohol
Alcohol acetona
safranina

Otros

Discos de bacitracina 0.04 U.I.
Discos de optoquina
Discos de novobiocina 5 microgramos
Discos de penicilina
Discos de eritromicina
Discos de oxaciclina
Discos de gentamicina
Discos de sulfametoxazol y trimetoprim
Discos de amoxicilina y ac. Clavulónico
Pipetas 1 ml. Estériles
Asa bacteriológica
Hisopos estériles
Cubre objetos
Porta objetos
Mecheros
Pinzas de disección
Palillos estériles

Equipo

Estufa
Baño maría
Autoclave
Microscopio óptico
Microscopio estereoscópico
Sobres para generación de CO₂
Tubos 0.5 nefelómetro de Mac Farland
Jarra Gas-pak

Material Biológico

Sangre de carnero 5%
Plasma de conejo (para prueba de coagulasa)
Cepa de *Staphylococcus aureus* β-lisina (+)

TÉCNICA

Sembrado:

Sembrar con asa con técnica de estria cruzada con dilución en los medios seleccionados (Amc, AS, ADS, A.ch + discos de bacitracina 10 U.I., ASM). Incubar 24 hrs/37°C.

Seleccionar colonias:

❖ AGAR SANGRE

Seleccionar colonias α -hemolíticas: Colonias grisáceas, puntiformes, con un halo hemolítico color verde y purificar en una placa de agar sangre, para posteriormente correrle pruebas para identificar.

Realizar prueba de optoquina:

- Seleccionar 3 ó 4 colonias bien aisladas con un hisopo humedecido en CN y sembrar un área de 3 cm de diámetro en una placa de agar sangre en forma masiva.
- Con unas pinzas de disección previamente esterilizadas en alcohol y al mechero, tomar un disco de optoquina y colocarlo sobre la superficie sembrada, presionar un poco con la pinza para evitar que se mueva el disco. Incubar 24hrs/37°C.
- Observar zona de inhibición de 14 mm o más. Cepas sensibles a la optoquina = *Streptococcus pneumoniae*.

Solubilidad en bilis (prueba en tubo):

- Transferir aproximadamente 0.5ml de un cultivo en caldo de Todd-Hewitt de 18 a 24 horas a dos tubos de prueba limpios.; otra alternativa es preparar una suspensión salina del m.o. tomado de un crecimiento de 18 a 24 horas en AS o AN.
- Agregar NaOH 0.1N para ajustar el pH a 7, si fuera necesario.
- Agregar una gota de rojo de fenol, como indicador de pH, a cada tubo de prueba.
- Agregar 0.5 ml de desoxicolato de sodio al 10% a uno de los tubos de prueba (tubo prueba).
- Agregar 0.5 ml de SSF estéril al segundo tubo de prueba (tubo control).
- Agitar con suavidad ambos tubos y colocarlos en la incubadora a 35°C, o en un baño de agua, durante 3 horas, controlando cada hora.
- Prueba positiva: (soluble en bilis): *Streptococcus pneumoniae*
- Prueba negativa: (insoluble en bilis): Estreptococos α -hemolíticos.

Selección de colonias β -hemolíticas : Colonias puntiformes grisáceas con un halo hemolítico amarillo alrededor, purificar en placas de AS , incubar 24hrs/37°C, para posteriormente correr pruebas de identificación.

Prueba de bacitracina 0.04 U.I.:

- Seleccionar 3 ó 4 colonias bien aisladas con un hisopo humedecido en CN y sembrar un área de 3 cm de diámetro en una placa de agar sangre en forma masiva.
- Con unas pinzas de disección previamente esterilizadas en alcohol y al mechero, tomar un disco de optoquina y colocarlo sobre la superficie sembrada, presionar un poco con la pinza para evitar que se mueva el disco. Incubar 24hrs/37°C.
- Cualquier halo de inhibición es positivo.

Antibiograma:

- Tomar 3 –4 colonias con la ayuda de un hisopo humedecido en CN y depositarlas sembrando en forma radial sobre placas de AMHS.
- Con la ayuda de unas pinzas de disección colocar los discos para G(+) sobre la zona sembrada, presionar un poco con la pinza para evitar que se muevan los discos. Incubar 24 hrs/37°C.
- Leer los halos de inhibición y cotejarlos en tablas para reportar los resultados.

❖ **AGAR DEXTROSA SABOURAUD:**

Seleccionar colonias blancas bien delimitadas.

Tubo germinativo:

- Se suspende una pequeña porción de la colonia aislada de la levadura en estudio en un tubo de prueba con 0.5 ml de suero humano o de conejo.
- Se incuba el tubo de prueba a 37°C por nomás de 2 horas.
- Se coloca una gota de la suspensión suero-levadura en un portaobjeto y se pone el cubreobjeto.
- Se lleva al microscopio para examinar y buscar los tubos germinales.
- La prueba no es válida si se examina después de las 2 horas.

❖ AGAR CHOCOLATE:

Crecimiento de colonias puntiformes grisáceas y húmedas y purificar en Ach para posteriormente correr pruebas.

Dependencia de factores:**Técnica 1:**

- De un aislamiento puro de las colonias sospechosas a identificar, se prepara una suspensión liviana en caldo de infusión de cerebro y corazón.
- Al traspasar la colonia, se debe tener la precaución de no jalar con el asa medio con hemina de la placa de aislamiento.
- Se inocula la suspensión en la superficie de la placa con la ayuda de un hisopo estéril.
- Se coloca una tira o disco con factor X y con factor V sobre el área inoculada, aproximadamente a 1 cm de distancia.
- Incubar en 3-5% de CO₂ a 37°C /18-24 horas.
- Requiere de factor X: Hay crecimiento alrededor de la tira impregnada con este factor.
- Requiere de factor V: Hay crecimiento alrededor de la tira impregnada con este factor.
- Requiere de factor X y V: Hay crecimiento en la interfase de las dos tiras impregnadas de los factores.

Técnica 2:

- De un cultivo puro, tomar 2 – 3 colonias bien aisladas con una asa bacteriológica y sembrar en forma masiva en la parte superior de la placa.
- Colocar una estria de *Staphylococcus aureus* β-hemolítico sobre la zona sembrada con la colonia problema.
- Al mismo tiempo sembrar una placa de Ach .
- Incubar 24 hrs/37°C en atmósfera de CO₂.
- Un crecimiento alrededor de la estria de *Staphylococcus aureus* β-hemolítico (satelitismo) indica dependencia de factor V.
- Un crecimiento en toda la caja de Ach indica dependencia de factor X.

Serología:

- Se prepara una suspensión densa en SSF de las colonias aisladas.
- Se colocan gotas únicas de la suspensión en cada uno de una serie de círculos en un portaobjeto de vidrio correspondientes al número de antisueros específicos a estudiar, más un control con SSF.
- Se agregan antisueros específicos de cada uno y se rota el portaobjeto.
- La aglutinación rápida (menos de 1 minuto) de m.o. por un antisuero específico y la ausencia de aglutinación en el control de SSF identifica el aislamiento como un serotipo específico.

❖ AGAR MacCONKEY

Se observa crecimiento colonial de bacterias Lac(+), formando colonias mucoides, con bordes irregulares.

❖ AGAR SALES MANITOL:

Seleccionar colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus*. Colonias amarillas, cremosas, con bordes bien definidos, y consiguiente acidificación del medio (rojo- amarillo), por la utilización del manitol.

Prueba de coagulasa: (técnica en tubo = coagulasa libre):

- En forma aséptica, se colocan 0.5 ml de plasma de conejo reconstituido en el fondo de un tubo de prueba estéril.
- Se agregan 0.5ml de un caldo de cultivo puro de 18-24 hrs del microorganismo en estudio.
- Se mezcla con suavidad rotando el tubo.
- Se incuba a 37°C por 2-10 horas.
- Se observa la formación de un coágulo visible.

Prueba de novobiocina:

- De un cultivo puro hacer una suspensión en SSF estéril igualada al tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.
- Humedecer un hisopo en la suspensión y sembrar en forma radial sobre placas de AMH y con la ayuda de unas pinzas colocar el disco de novobiocina.
- Incubar 24 hrs/37°C y observar la presencia de un halo de inhibición mayor a 12 mm de diámetro.

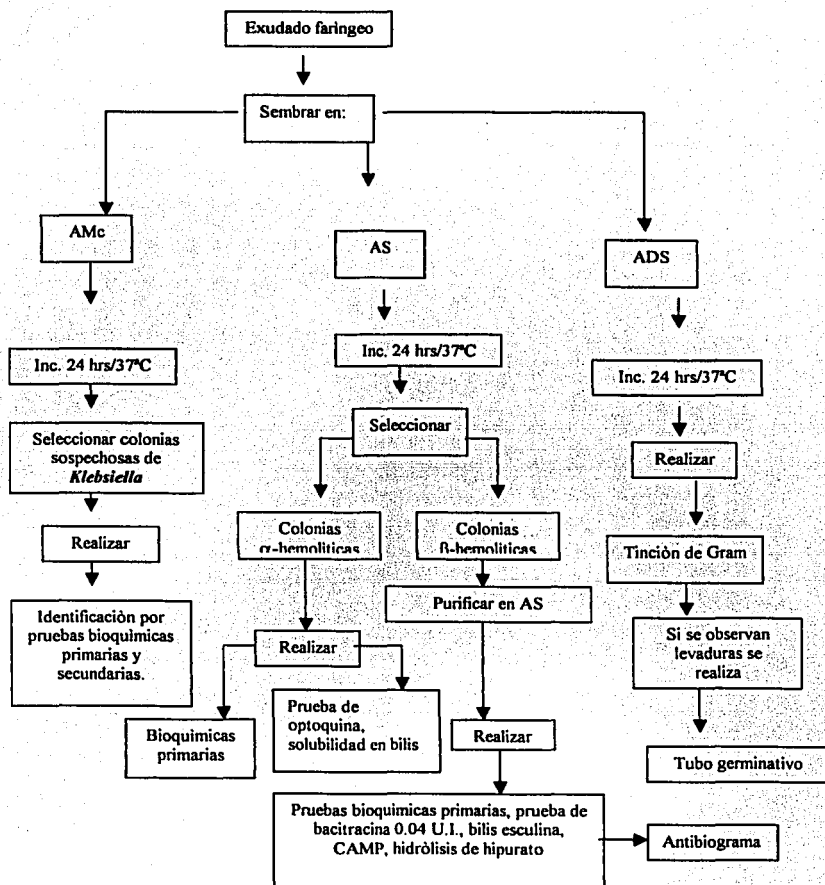
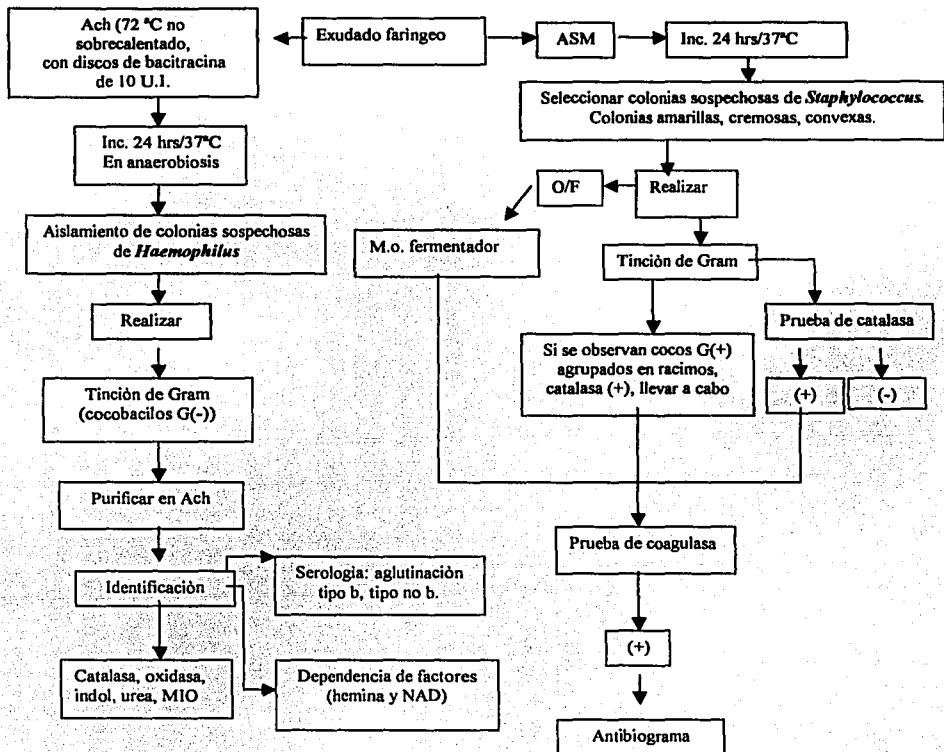
DIAGRAMA DE TRABAJO 1.

DIAGRAMA DE TRABAJO 2.

HOJA DE RESULTADOS.**EQUIPO:****FECHA:**

<i>PRUEBAS REALIZADAS Para Staphylococcus</i>	
Tinción de Gram	
Catalasa	
O/F	
Coagulasa	
Nitratos	
Úrea	
Novobiocina	

M.o. identificado:**ANTIBIOGRAMA**

<i>SENSIDISCO</i>	<i>Sensible (S)</i>	<i>Resistente (R)</i>	<i>Intermedio(I)</i>
Penicilina			
Eritromicina			
Ampicilina			
Dicloxacilina			
Gentamicina			
Sulfametoxazol-trimetoprim			
Amoxi.cilina-Ac. Clavulánico			

HOJA DE RESULTADOS.**EQUIPO:****FECHA.**

<i>PRUEBAS REALIZADAS Streptococcus.</i>	
Tinción de Gram	
Catalasa	
O/F	
Hemólisis	
Bacitracina 0.04 U.I.	
Bilis esculina	
Crec. En 6.5% NaCl	
Hidrólisis de hipurato	
CAMP	
Solubilidad en bilis	
Susceptibilidad a la optoquina	

M.o. Identificado:**ANTIBIOGRAMA**

<i>SENSIDISCO</i>	<i>Sensible (S)</i>	<i>Resistente (R)</i>	<i>Intermedio (I)</i>
Penicilina			
Eritromicina			
Ampicilina			
Dicloxacilina			
Cefotaxima			
Amoxicilina- .Ac.clavulánico.			

BIBLIOGRAFIA

1. Cruz Jiménez. Manual de Bacteriología Clínica. Comité editorial F.E.S. Cuautitlán. 1ª. Edición. 1994. México, D.F. pp. 35-40
2. Edward, Alcamo. Fundamentals of microbiology. Edit. Benjamin/Cummings publishing company. 3ª. Edición. 1997. Menlo Park, Calif. Pp 219-312.
3. Escobar G. Alejandro. Manual de técnicas de laboratorio (Virología y Bacteriología). 1995. Vol. 1. Pp 49-78.
4. Granados Villaverde. Microbiología. Edit. Paraninfo. 1ª. Edición. 1998. México, D.F. pp 211-221.
5. Kóneman. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 3ª. Edición. 1992. España.
6. Laura Sánchez. Y col. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. American society for Microbiology. 1997. Vol. I,II. No. 21. Pp 6855-6857.
7. Microbiology for the Health sciences, Edit. J.B. Lippincott Company. 4ª. Edición. 1992. Philadelphia Pennsylvania. Pp 172-335.
8. Ruth Foxwell, et. Al . Nontypeable *Haemophilus influenzae* Pathogenesis and Prevention . Microbiology and Molecular Biology Reviews. June. 1998. Vol. 62 No. 2. Pp 294-308.
9. Smith and M. Baker. Cefsulodin chocolate blood agar: a selective medium for the recovery of *Haemophilus influenzae* from the respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J. Med. Microbiol. Vo. 46. 1997 pp 883-885..
10. Tortora-Funke-Case. Microbiology an Introduction. Edit. Benjamin/Cummings publishing company. 6ª. Edición. 1997. Menlo Park, Calif. Pp 603-710.

DIAGNOSTICO DE *Mycobacterium tuberculosis*. Introducción:

Las infecciones de las vías respiratorias bajas pueden afectar tráquea, y el árbol bronquial (traqueítis, bronquitis y bronquiolitis) y/o tejido pulmonar (alveolitis y neumonía).

Siendo la tuberculosis una de las más importantes y frecuentes enfermedades del hombre, cuya situación epidemiológica se relaciona directamente con el estado económico y social de cada región. En marzo de 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) designó a la tuberculosis como una emergencia de salud pública mundial debido al aumento de casos que se han presentado durante los últimos años, no solamente en los países en desarrollo, sino también en los desarrollados^{(8,4,3)2}

En México la tuberculosis es un problema serio de salud pública y el continuo incremento en la infección debido al crecimiento poblacional en áreas con deficiente higiene y bajos recursos socioeconómicos, principalmente en estados como Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Guerrero y Baja California, SLP. Los adultos son los más afectados por la tuberculosis pulmonar, presentando las tasas más altas. En la tuberculosis extrapulmonar, los grupos etarios más afectados son de 1 a 4 años de edad, los mayores de 65 y los de 45 a 64 años respectivamente. Las causas que condicionan la enfermedad se encuentran con toda seguridad en la posición socioeconómica, sanidad y recursos de salud con que cuenta el país, pero también en el desconocimiento de la historia natural de la enfermedad, patogenia y recursos diagnósticos y terapéuticos.^(1,10)

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, generalmente de curso subagudo o crónico, involucra diversos órganos y tejidos (lesiones cavitarias lóbulos superiores) preferentemente a nivel pulmonar, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria intracelular miembro de la familia *Mycobacteriaceae*. Mide 1-4 μm de longitud y 0.2-0.6 μm de diámetro, absorbe el colorante carbolfucsina y una vez teñido resiste a la decoloración por ácidos y alcoholes, de ahí la denominación común de bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR)^(1,9)

Si bien en ocasiones puede reconocerse patrones distintivos de infección pulmonar, más a menudo la recuperación del microorganismo causal es un requisito para hacer un diagnóstico definitivo.

El mejor modo de diagnóstico de tuberculosis es mediante la recuperación e identificación del microorganismo a partir del paciente. Durante muchos años, tanto el diagnóstico como el tratamiento de la tuberculosis dependían de los síntomas clínicos, evidencias radiológicas de la enfermedad y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo. Hoy debe aislarse el agente causal, identificarlo y efectuar pruebas de susceptibilidad para drogas antituberculosas^(2,6,10)

El aislamiento de micobacterias de esputo y otros especímenes clínicos (*Klebsiella pneumoniae*), representa un problema especial para el laboratorio. Las micobacterias necesitan un tiempo prolongado para su reproducción, aproximadamente 15-22 horas., para *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que el tiempo de generación de otras bacterias que pueden estar presentes en la muestra puede ser tan breve como 20 a 30 minutos. Este índice desproporcionado de crecimiento entre las micobacterias y otras bacterias puede producir una rápida acumulación de metabolitos ácidos que licuen el medio de cultivo, tomándolo no satisfactorio para la recuperación de micobacterias. Por ésta razón, el aislamiento exitoso de micobacterias depende, en gran parte, de la supresión selectiva de bacterias contaminantes, por métodos de descontaminación de las muestras como el tratamiento con L-cisteína+NaOH4% y de los medios de cultivo empleados (Lowenstein Jensen, medio líquido Middlebrook enriquecido en ácido palmítico).

También puede llevarse el diagnóstico por métodos rápidos tales como:

Pruebas cutáneas: (técnica de Mantoux) que utiliza un derivado proteico purificado PPD.

Serología: Fijación de complemento, hemaglutinación, radioinmunoensayo, ELISA.

Diagnóstico molecular.^(3,5,8)

OBSERVACIONES	RESULTADO
No se observaron BAAR en 100 campos revisados	-
Menos de 1 BAAR/ campo en promedio, en 100 campos observados.	+
1-10 BAAR/campo en promedio en 50 campos observados.	++
Más de 10 BAAR/campo, en 20 campos observados	+++

Al realizar una tinción de Ziehl-Neelsen de alguna muestra para la detección de *Mycobacterium* y al observar al microscopio los resultados se reportan de acuerdo a la tabla anterior.⁽⁶⁾

Toma de muestra.

En la actualidad se emplean diversas técnicas para obtener muestras de vías respiratorias bajas, que varían de la recolección de una muestra de expectoración a procedimientos más complejos, como aspiración transtraréica (transtraqueal) , biopsia transbronquial, cepillado bronquial, lavado bronquial, lavado gástrico, orina.

En la toma de esputo, si el paciente hace gárgaras inmediatamente antes de obtener la muestra se reduce el número de bacterias orofaríngeas contaminantes. No se recomienda utilizar un enjuague bucal o sustancia para gárgaras de uso comercial. Recolectar muestras de expectoración por la mañana ya que contienen secreciones acumuladas durante la noche en las cuales es más probable que las bacterias patógenas estén concentradas.

Cuando la producción de esputo es escasa, la inducción con solución fisiológica nebulizada a través de un respirador con presión positiva puede ser efectiva para obtener una muestra más representativa de las vías respiratorias inferiores. Evitar el uso de solución fisiológica preparada para diluir fármacos parenterales porque contiene sustancias antibacterianas.

Se dispone de dispositivos especiales para la recolección de esputo y también puede usarse un frasco con boca ancha y una tapa bien ajustada. Para impedir la contaminación del exterior del envase, instruir al paciente para que presione el borde de éste debajo del labio inferior para recoger toda la muestra expectorada, minimizando la contaminación externa.

Las muestras deben procesarse lo antes posible después de la recolección.

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se aisle e identifique el agente causal de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), **como**, por medio de una buena toma de muestra (espectoración, orina, sangre, LCR, biopsias de tejidos), cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas primarias y secundarias **para** dar un diagnóstico de tuberculosis.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. **Que** se obtenga una buena toma de muestra (esputo, lavado gástrico, LCR, orina, biopsias), **como**, con la ayuda de espectorantes y técnicas especiales o microcirugías, **para** la obtención correcta de la muestra.
2. **Que** se realice la descontaminación de la muestra, **como**, por medio de una hidrólisis alcalina con NaOH (4%), **para** eliminar la flora normal bacteriana contaminante.
3. **Que** se realice la tinción de Ziehl-Neelsen, **como**, siguiendo la técnica descrita **para** determinar la presencia de BAAR.

MATERIAL

Medios de cultivo en tubo

Agar Löwestein Jensen

Por equipo

1

Reactivos

Azul de bromotimol 0.25%

Metanol

Carbol-fuchshina

Alcohol acido

Etanol

Acido clorhídrico concentrado

Azul de metileno

Solución salina fisiológica

Hidróxido de sodio 4%

Fenol 5%

Acido clorhídrico 5%

Otros

Tubos de ensaye

Porta objetos

Cubre objeto

Papel filtro estéril

Mecheros

Pipetas Pasteur estériles

Pipetas de 5 ml. estériles.

Agua destilada estéril.

Equipo

Autoclave

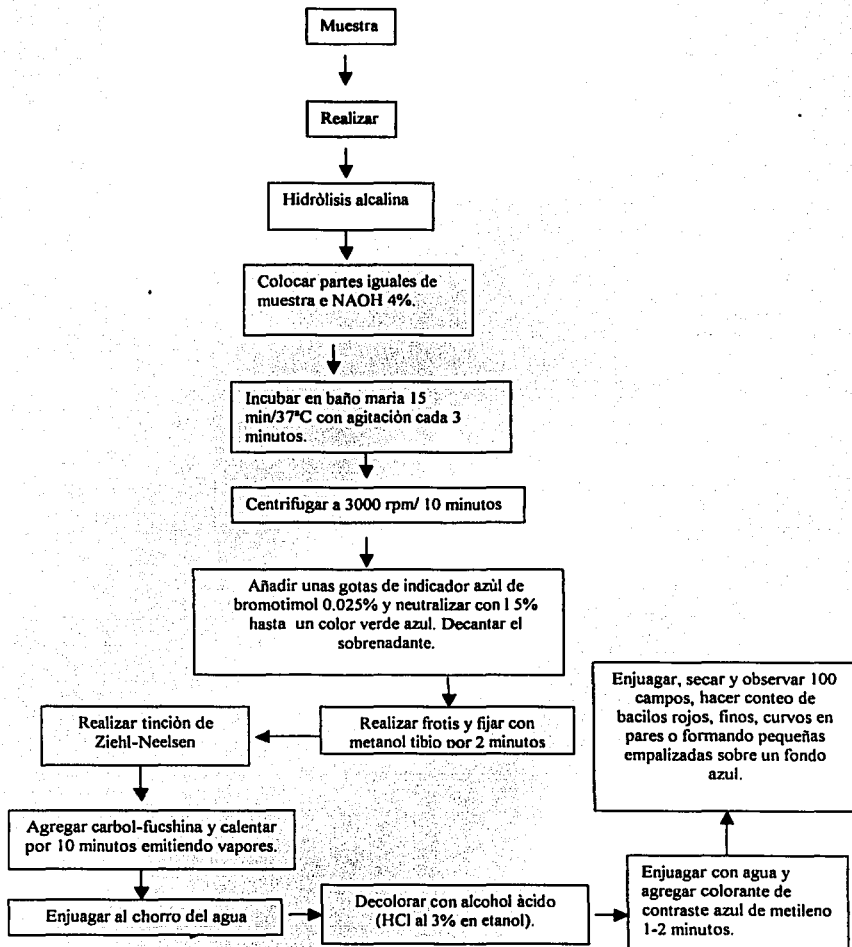
Baño María

Estufa

Microscopio óptico

Microscopio estereoscópico

Balanza

DIAGRAMA DE TRABAJO

HOJA DE RESULTADOS.

OBSERVACIONES	RESULTADO
No se observan BAAR en 100 campos revisados	
Menos de 1 BAAR/ campo en promedio, en 100 campos observados.	
1-10 BAAR/campo en promedio en 50 campos observados.	
Más de 10 BAAR/campo, en 20 campos observados.	

BIBLIOGRAFIA

1. Cabello R.R. Microbiología y parasitología humana. Edit Panamericana. 1ª edición. Pp 323-328. 1993.
2. Ellner J.J. Review the Immune response in human tuberculosis implications for tuberculosis control. Journal Infect Dis. 1997. Num. 176. Pp 1351-1359.
3. Espitia C.I. Identification, isolation and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoprotein antigen. Clin Exp. Immunol. 1989. Num 77. Pp. 378-383.
4. Farga V. Tuberculosis. Edit. Mediterráneo. 2ª edición. Chile. 1992.
5. González Saldaña N. Infectología Clínica Pediátrica. Edit. Trillas. 3ª edición. 1990. Pp 105-145.
6. García García M.L. Tuberculosis. Edit. Valdespino Gómez J.L. Editor. 1994. Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, Tratamiento y distribución Geográfica. INDRE. SSA. México, D.F. pp 215-226.
7. Lewinson D.M. Characterization of human CD8+ T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis- infected antigen-presenting cells. J. Exp. Med. 1998. Num. 187. Pp 1633-1640.
8. Murray P. Microbiología Médica. Edit. Mosby Year Book Company. España. 1992.
9. Pacheco. C. Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin. Vacunas, Ciencia y salud. INDRE. SSA. México, D.F. 1994.
10. Orme M. T cell response to Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis. 1993. Num. 167. Pp 1481-1497
11. Oros Salinas. Tesis. Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de bajo peso molecular de Mycobacterium tuberculosis en pacientes con tuberculosis activa, utilizando la técnica de Western Blot. 2000.

EXUDADO CERVICO-VAGINAL O URETRAL.

Introducción:

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un problema importante en la salud, el estudio de los exudados cérvico-vaginales implica la investigación tanto de microorganismos patógenos como de componentes de la flora normal^(1,5)

La introducción de los anticonceptivos orales y de los dispositivos intrauterinos ha dado como consecuencia cambios en el comportamiento sexual humano y una marcada disminución del uso de condones. Esto es responsable en gran parte del enorme aumento de la frecuencia de enfermedades sexualmente transmitidas.

Generalmente, los microorganismos causales de estas infecciones se adquieren por contacto sexual o directo. Sin embargo, algunos microorganismos que son parte de la flora y están normalmente presentes en muy pequeño número pueden aumentar en cantidad suficiente como para causar síntomas. Las infecciones pueden extenderse al tracto genital superior, afectando útero, trompas de Falopio, ovarios o la cavidad abdominal (enfermedad inflamatoria pelviana).^(2,9,11)

Las infecciones del tracto genital masculino son invariablemente causadas por microorganismos adquiridos por contacto sexual.

Los patógenos de transmisión venérea provocan infecciones de la uretra, cérvix y vagina en la mujer y se pueden transmitir por vía sexual a la uretra y próstata en el hombre.

Se producen también infecciones por microorganismos de patogenicidad ambigua generalmente habitantes normales de otras regiones del organismo, y en este tracto pueden ejercer un papel patógeno.^(1,4,6)

Actualmente, el enfoque tradicional para el diagnóstico de infecciones genitales supurativas agudas está sujeto a modificaciones por diversos motivos: 1) descubrimiento de nuevos síndromes clínicos. 2) recuperación más frecuente de *Chlamydia trachomatis* y virus *Herpes* simple como patógenos significativos.

3) Implementación de nuevos procedimientos basados en la detección directa de microorganismos patógenos o antígenos en secreciones genitales^(3,8,10)

La mayor parte de los cultivos de material genital es remitida al laboratorio de microbiología clínica para la recuperación e identificación de patógenos predominantes *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*.

Además se producen infecciones por microorganismos de patogenicidad ambigua generalmente habitantes normales de otras regiones del organismo, que aquí pueden crecer en papel patógeno, tales como: bacilos Gram (-) aerobios y anaerobios, *Micoplasmas* y *Streptococcus* β -hemolítico grupo B En la mujer embarazada el grado de infección cérvico-vaginal con *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B varía de acuerdo a la edad, el número de gestación y sitio de la toma de la muestra (mayor en la vagina que en el cérvix).^(5,9,11)

El exámen de frotis directos con tinción de Gram de secreciones genitales puede ser útil como guía para la selección de medios apropiados para la recuperación de los microorganismos observados.^(2,4)

Gardnerella vaginalis, un microorganismo implicado en vaginosis inespecífica, si bien el diagnóstico de laboratorio en general se hace por la observación de células pista o guía en un frotis preparado de secreciones vaginales, pH, prueba de KOH, tipo y olor característico de la secreción (color grisáceo delgada y homogénea y olor a pescado.)

Sin embargo para el caso de *Chlamydia*, *Mycoplasma*, se deben considerar cultivos negativos previos y respuesta negativa a tratamientos, recurriéndose a pruebas de diagnóstico especiales como inmunofluorescencia, ELISA, etc.^(2,4)

Toma de muestra:

En mujeres con signos y síntomas de infección genital aguda (vaginitis, flujo transvaginal, escoriación, ardor, dolor en la relación sexual, inflamación pelviana ,las muestras con más frecuencia se obtienen de exocervix. Las muestras cervicales se obtienen con la ayuda de un espejo vaginal.

Se aconseja usar un hisopo con un soporte de plástico y una punta de dacrón o poliéster.

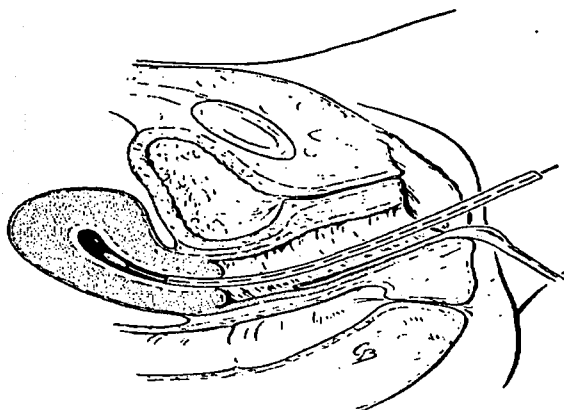
Se inserta la punta del hisopo pocos milímetros más allá del orificio cervical, se rota con firmeza para obtener exudado y células cervicales , se retira cuidando de no tocar las paredes de la vagina. Pueden obtenerse muestras uretrales dando masajes en la uretra y recogiendo la secreción o insertando un pequeño hisopo urogenital en la uretra y dejándolo colocado unos pocos segundos para que las fibras se saturen con el exudado.

En casos de enfermedad inflamatoria pelviana profunda, pueden ser necesarios cultivos de endometrio o aspiración de flujo por medio de laparoscopia o culdoscopia. Las muestras endometriales se obtienen mejor insertando el hisopo a través de un catéter de poco calibre que se ha introducido en el canal cervical. Si se usa esta técnica, hay menos posibilidades de contaminar la muestra con moco del orificio cervical o la vagina.

De inmediato deben hacerse frotis directos del material obtenido para tinción de Gram y/o detección directa de antígenos.

El material restante debe inocularse rápidamente en medios de cultivo selectivos o en un sistema de transporte.

Toma de muestra para hombres, con hisopo de dacrón se inserta en la uretra hasta más o menos 3 cm., rotando suavemente, si la secreción es escasa o nula, se realiza masaje prostático para obtener líquido espermático o se le pide al paciente orinar y centrifugar ésta y se trabaja con el sedimento.

FIGURA No. 6**TÉCNICA PARA OBTENER MATERIAL ENDOMETRIAL PARA CULTIVO**

A través de un espéculo se introduce un catéter hacia el orificio cervical y se pasa un hisopo por el catéter hacia la cavidad uterina. Esto ayuda a impedir la contaminación del hisopado por contacto con las paredes vaginales o el orificio cervical

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se aislen e identifiquen las bacterias que ocasionan infecciones en el tracto genital, *como*, por medio de una buena toma de muestra, cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas primarias , secundarias y especiales *para* dar un buen diagnóstico.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. *Que* se obtenga una muestra de secreción cervical , vulvar o uretral, *como*, por la introducción de un hisopo en las partes afectadas y un espejo vaginal, (cuando la muestra es vulvar no se usa el espejo), ambos esteriles, *para* el aislamiento de los microorganismos involucrados en la infección.
2. *Que* se aislen los patógenos presentes en la muestra, *como*, sembrando en medios de cultivo de Agar chocolate, Thayer Martin, Agar sangre+antibiótico, Agar Biggy, Agar sangre, Agar Cassman , Agar SM, Mac Conkey, *para* lograr una identificación posterior de éstos.
3. *Que* se identifique el microorganismo *como*, utilizando pruebas bioquímicas primarias, secundarias y pruebas especiales frotis directo, *para* dar un resultado de género y especie y así el médico pueda prescribir un tratamiento.

MATERIAL**Medios de cultivo en caja.**

	Por equipo
Agar sangre + antibiótico (Ac. Nalidixico+Gentamicina)	1
Agar sangre	2
Agar chocolate (A. GC+antib.no. 2+sangre)	3
Agar Cassman (sangre humana 10%)	1
Agar Sales manitol	1
Agar Mac Conkey	1
Agar Biggy o SDA	1
Agar soya tripticaseína	1
Agar Muller Hinton	1
Agar Muller Hinton + sangre	1
Agar GC o Thayer Martín	1

Medios de cultivo en tubo

	Por equipo
Caldo soya tripticaseína	1
Medio de KIA	1
Medio de citratos	1
Medio de malonatos	1
Medio de O/F	2
Hidrólisis de hipurato	1
Nitratos	1
Rojo de metilo	1
Vogues proskauer	1
SIM	1
Arginina, lisina,	1

De estos medios se utiliza 1 por equipo de cada uno, son preparados en medio CTA: maltosa, manosa, salicim, xilosa, manitol, lactosa, fructuosa.

Otros

Hisopos estériles
Palillos estériles
Papel filtro estéril
Asa bacteriológica
Pipetas de 1 ml. estériles
Pipetas de 5 ml. estériles
Tubos estériles
Porta objetos
Cubre objetos
Mecheros
Pinzas de disección
Discos de novobiocina de 5 microgramos
Discos de amikacina
Discos de gentamicina
Discos de sulfametoxazol y trimetoprim
Discos de nitrofurantoína
Discos de ceftazidima
Tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland
Sobres para anaerobiosis
Jarra Gas-pak

Equipo:

Estufa

Baño maría

Microscopio óptico

Material biológico.

Sangre de carnero al 5%

Plasma

Suero descomplementado

Cepa de *Staphylococcus β-lisina (+)***Reactivos**

Aceite mineral estéril

Aceite de inmersión

Hidróxido de potasio 10%

Tiras reactivas para pH

Cloruro férrico

Alfa naftilamina

Acido sulfanílico

Zinc metálico

Rojo de metilo

Alfa naftol 5%

Hidróxido de potasio 40%

Reactivo de Ehrlich o Kovak's

Cristal violeta

Lugol

Alcohol-acetona

Safranina

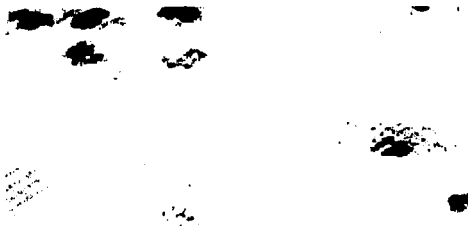
N-N-tetrametilparafenilendiamina

Peróxido de hidrógeno 30%

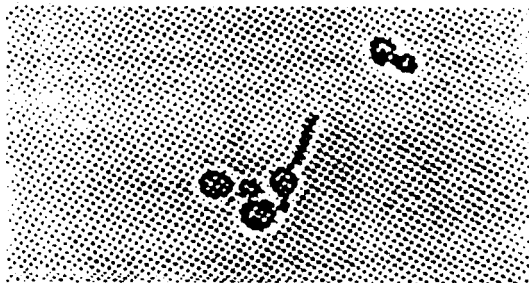
TÉCNICA:**Celulas pista. (Gardnerella)**

1. Realizar un frotis de la muestra directo.
2. Teñir con Gram.
3. Observar células de descamación tapizadas con bacilos G(-).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Prueba de tubo germinativo. (Candida)**

1. Suspender una porción de la colonia aislada en un tubo con 0.5 ml de suero humano o de conejo (descomplementado).
2. Incubar 37°C 2 horas (no más).
3. Colocar una gota de la preparación en un portaobjeto y se pone el cubreobjeto encima de la preparación.
4. Observar al microscopio en busca de tubos germinales. (pseudohifas). La presencia de al menos 60% de células germinadas es cuando se considera una prueba (+)

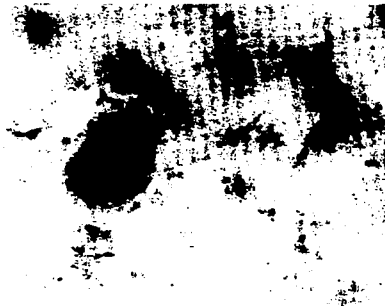


Prueba de KOH. (Gardnerella)**TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1. Colocar una gota de exudado (cérvico-vaginal).
2. Poner una gota de KOH 10%.
3. Percibir el olor a pescado por la presencia de cadaverina y pu tresina

Preparación en fresco para observación de Trichomonas:

1. Colocar una gota de exudado (cérvico-vaginal) sobre un porta objetos
2. Colocar encima un cubre objetos.
3. Observar al microscopio óptico con el obj. 40X y se buscar la presencia de los protozoarios flagelados, se observan en movimiento.



Prueba de CAMP. (*Streptococcus Grupo B*)

1. Realizar una siembra en A.S., del estreptococo que se quiere identificar.
2. Colocar una estria de *Staphylococcus aureus* β -lisina en forma perpendicular a el sembrado del estreptococo.
3. Las dos estrias no deben tocarse.
4. Incubar la caja por 24hrs/37°C.
5. Realizar lectura. Observar una hemólisis en forma de flecha al unirse la hemólisi provocada por las 2 bacterias.
6. *Streptococcus* β -hemolítico grupo B = productor de factor CAMP

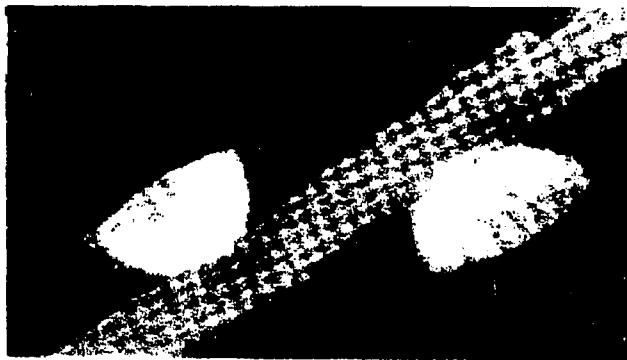


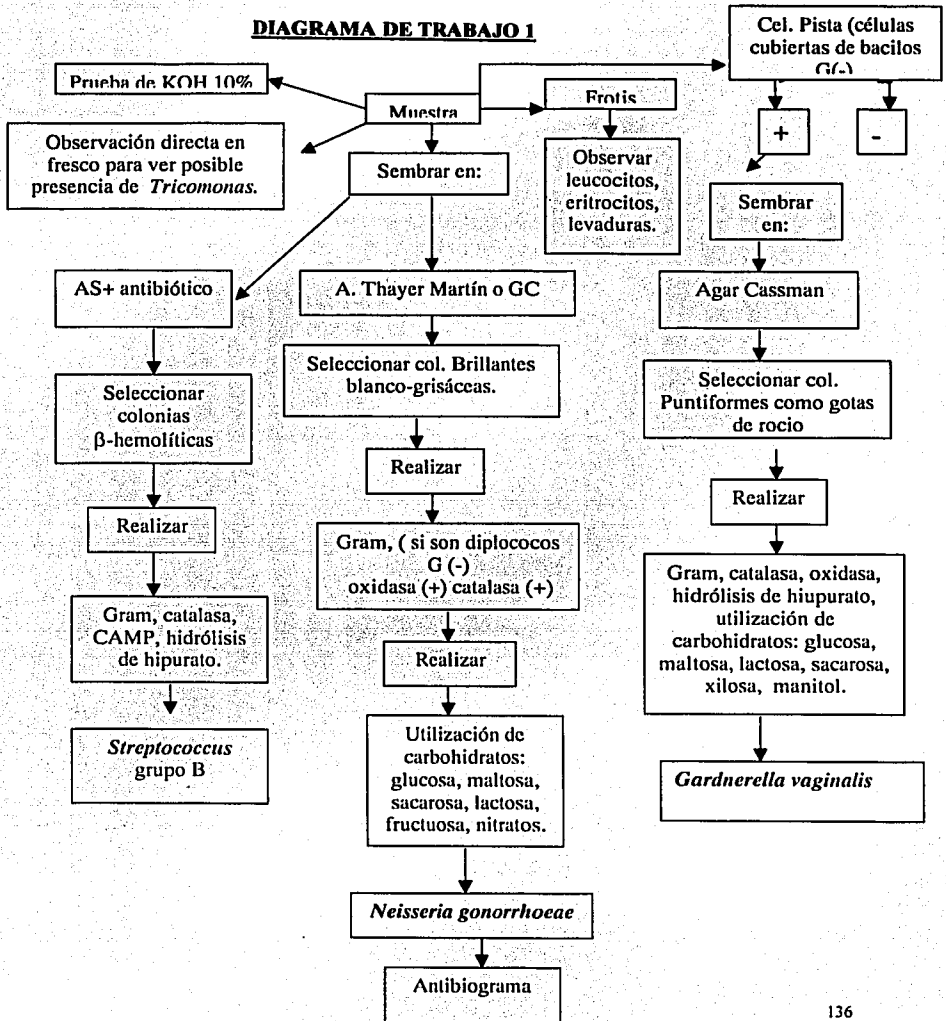
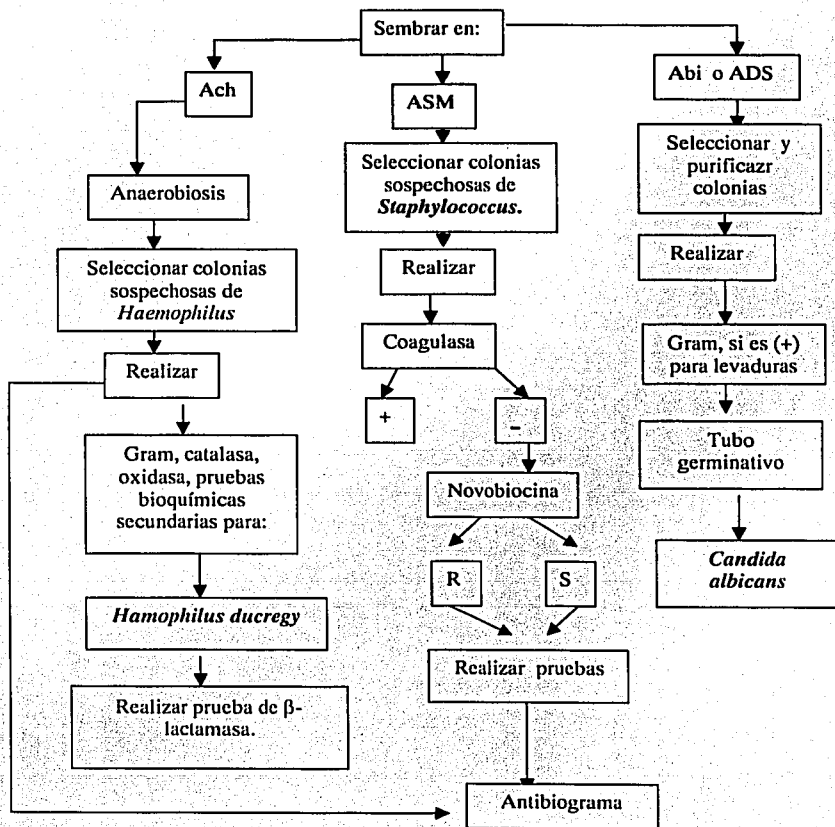
DIAGRAMA DE TRABAJO 1

DIAGRAMA DE TRABAJO 2.

HOJA DE RESULTADOS**EQUIPO.****FECHA.**

PRUEBAS REALIZADAS	M.O.	M.O.
INDOL		
ROJO DE METILO		
VOGUES Proskauer		
CITRATOS		
KIA o TSI		
AC. SULFHIDRICO		
LISINA		
ARGININA		
ORNITINA		
MOTILIDAD		
MALONATOS		
OXIDO FERMENTACION		
LACTOSA		
MANITOL		
SALICIM		
MALTOSA		
XILOSA		
NITRATOS		
MANOSA		
FRUCTUOSA		
OXIDASA		
CATALASA		
TINCION DE GRAM		
HIDRÓLISIS DE HIPURATO		
COAGULASA		

M.o. Identificado:

Ver tablas de identificación.

HOJA DE RESULTADOS.**ANTIBIOGRAMA****GRUPO:****FECHA:**

SENSIDISCO	S (SENSIBLE)	R (RESISTENTE)	I (INTERMEDIO)
Cefalotina			
Amikacina			
Gentamicina			
Acido nalidixico			
Sulfametoxazol trimetoprim			
Penicilina			
Ampicilina			
Nitrofurantoina			
Ceftazidima			

BIBLIOGRAFIA

1. Arredondo E.L. Búsqueda de *Neisseria gonorrhoeae* en pacientes mujeres que acudieron a 2 clínicas especializadas en la Ciudad de México para consulta médica en un periodo de 6 meses. Tesis. FES-C. U.N.A.M. México. 1993
2. Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1997. Pp 148-156.
3. Balows Albert. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edición. Editorial American Society for Microbiology. 1995. Washington, D.C. pp. 1073-1088.
4. Escobar G. Alejandro. Manual de Técnicas de laboratorio. Vol. 1. S.S. INDRE. México, D.F. 1995. Pp 111-138
5. Evangelista A.L. Laboratory Diagnosis of *Gonorrhoeae*. Washington. American Society for Microbiology Cumitech 4 A. 1996.
6. Koneman, Diagnóstico microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 2ª- edición. España. 1992.
7. Lennette Edwin. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1995. Pp 306-312.
8. Martínez Ramos Agustín. Gonococo (1ª parte). Infectología. No.2 Febrero. 1995. Pp 71-75
9. Ortiz C.A. Aislamiento de *Gardnerella vaginalis* de mujeres con vaginitis que acuden a consulta al Centro de Salud Dr. José Castro Villagrana. Tesis. ENCB. I.P.N. México, D.F. 1998.
10. P.Quintana Elda. La importancia Clínica de los *Staphylococcus coagulasa* (-) y su identificación en el laboratorio. Lab.-acta. Vol. 5 Num. 2 1996.
11. Sheser Robert. Diagnóstico de infecciones vaginales comunes. Infectología. 1997. No.1 (enero). Pp 49-55
12. Suplemento. Vulvovaginitis por *Candida*. Infectología. 1995. No.6 (junio) pp 162-2
13. Wandy L. Beatty. Persistent Chlamydiae: from cell Culture to a Paradigm for Chlamydial Pathogenesis. Microbiological Reviews. 1994. Vol. 58. Num. 4. Pp. 686-696.

HEMOCULTIVO.

Introducción:

La sangre es probablemente una de las muestras clínicas importantes enviadas al laboratorio de microbiología. ^(9,14)

La demostración de la presencia de un microorganismo a partir de la muestra de sangre, muy a menudo refleja una infección activa y diseminada en los tejidos. Por otro lado, un cultivo negativo por lo general, excluye el papel de los agentes bacterianos en el padecimiento, ya que la administración de antibióticos puede agravar la regulación de la sepsis por causar la lisis de una gran cantidad de bacterias, habiendo entonces más liberación de endotoxinas. ^(12,16)

Dado que la tasa de mortalidad por septicemia puede ser de 40% o más en ciertos pacientes internados (el shock séptico es la causa de casi 400,000 casos y 100,000 muertes cada año), la recuperación a tiempo de bacterias de la sangre del paciente (bacteremia) puede tener un gran significado diagnóstico y pronóstico. ^(10,11,12)

La bacteremia puede ser transitoria, intermitente o continua, reflejando diversos mecanismos de entrada básicos de bacterias en el torrente circulatorio. Es posible una bacteremia transitoria cuando se introducen microorganismos a menudo de la flora normal, en la sangre (al cepillarse los dientes, extracción dental, herida, mordedura, hacer fuerza al defecar). A menudo se produce bacteremia intermitente cuando bacterias de un sitio infectado son liberadas espasmódicamente hacia la sangre desde abscesos extravasculares, cavidades empiémicas o infecciones difusas (celulitis, peritonitis, artritis séptica). La bacteremia continua es habitual en casos de endocarditis bacteriana subaguda o a partir de fistulas arteriovenosas infectadas, catéteres intraarteriales o cánulas in situ. Sin embargo, en un tercio de las bacteremias puede no determinarse el origen de los m.o. ^(7,8,10,11,15,16)

Sangre y linfa contienen gran cantidad de células fagocíticas de defensa, sin embargo si esta barrera falla los m.o. pueden experimentar una proliferación incontrolada en la sangre, una alteración llamada septicemia. Si estas bacterias causan lisis de los glóbulos rojos de la sangre, la liberación de metales contenidos en la hemoglobina puede dar como resultado un crecimiento acelerado de microorganismos. Clínicamente cuando una persona padece septicemia tiene frío, fiebre, malestar general, taquicardia, hiperventilación y toxicidad o postración ^(2,5,6)

Las condiciones tóxicas que resultan de la septicemia son llamadas sepsis, los m.o. más frecuentemente asociados con sepsis son bacilos Gram (-) (*Pseudomonas*,

E. coli, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella typhi*, *Brucella*), a pesar de que algunas bacterias Gram (+) (*Streptococcus Staphylococcus*, levaduras,, *Haemophilus*, *Listeria*) están ocasionalmente implicadas' (11)

Las bacterias Gram (-) contienen toxinas las cuales son liberadas y provocan lisis de la célula. Las endotoxinas provocan un síndrome llamado shock séptico, o sepsis Gram (-).

La infusión de endotoxinas en humanos es suficiente para iniciar el proceso inflamatorio que se produce en la sepsis.

Menos de una millonésima de un mg de endotoxina es suficiente para causar los síntomas (1,5,6,9,13,14)

Las bacterias Gram (+) carecen de LPS en su membrana pero pueden desencadenar sepsis y shock séptico por la acción de productos originados en su pared (peptidoglicano, ac. Teicoico) y de proteínas intrabacterianas (proteína M, estreptocinasas, alfa-toxina, enterotoxinas) liberadas al medio. Por un lado, el peptidoglicano, los ac. Teicoicos y las proteínas de superficie, son capaces de estimular la vía alterna del complemento y la liberación de TNF y diversas interleucinas. Por otro lado, las toxinas pueden iniciar la cascada inflamatoria. Así la toxina del síndrome de shock tóxico, producido por *Staphylococcus aureus*, es un estimulador de los monocitos más potente que el LPS de los Gram (-). (7,8,11,15)

Es imperativo que el laboratorio efectúe los hemocultivos correctamente e informar resultados exactos lo antes posible. Los factores críticos que deben decidir los jefes del laboratorio incluyen: tipo de recolección, el número de toma de muestra, la hora de los hemocultivos, el volumen de sangre a cultivar, la cantidad y la composición del medio de cultivo, cuando y con cuánta frecuencia efectuar subcultivos y la interpretación de los resultados. (10,12,16)

Las botellas para hemocultivo, contienen medio de Ruiz Castañeda modificado o medios bifásicos comerciales, contienen base de caldo soya tripticascina y agar soya tripticaseína, extracto de levadura, fuente de carbono y nitrógeno, anticoagulante (polianetol sulfonato de sodio 0.03%-0.05%). (1,4,7)

Toma de muestra:

Es necesario seguir unas estrictas normas de asepsia. Los pasos correctos a seguir son:

1. Retirar los tapones externos de los frascos de hemocultivo.
2. Desinfectar los tapones de goma con alcohol-yodo, dejándolos secar al menos un minuto.

Para reducir la posibilidad de contaminación con m.o., de la piel, el sitio de venopunción idealmente debe prepararse siguiendo estos pasos.

1. Lavar con jabon verde
2. Enjuagar con agua destilada
3. Aplicar tintura de yodo y yodopovidona al 1-2% y dejar secar durante 1 ó 2 minutos.
4. Eliminar el yodo con alcohol al 70%.

En la práctica el lavado con jabon verde habitualmente se omite, sin embargo el uso combinado de un compuesto con yodo y alcohol para desinfectar el sitio de venopunción es esencial. Si nuevamente debe palpase el sitio después de su preparación con yodo-alcohol, habrá que desinfectar el dedo o usar un guante estéril. Si se utiliza yodopovidona, debe omitirse el paso 4. Sin embargo es necesario asegurar que la solución de yodo-povidona esté seca antes de hacer la venopunción.

Pueden obtenerse hemocultivos utilizando aguja y jeringa o por medio del sistema cerrado. Nunca debe extraerse sangre para cultivos de un catéter intravenoso o intraarterial "in-situ".

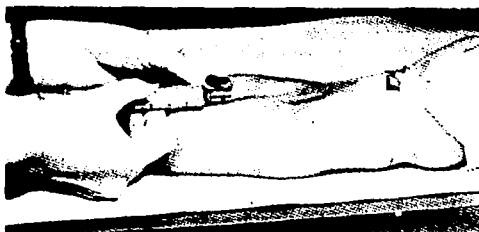
A los adultos se les debe extraer 10-30 ml., de sangre en cada venopunción. En lactantes y niños que tiene una volemia menor, de 1-5 ml., de sangre para cultivo pueden ser suficientes.

La sangre para cultivo debe agregarse al caldo para cultivo con una relación de aproximadamente de 1:5 a 1:10 para diluir cualquier cantidad antibacteriana inerte, la acción de antibióticos circulantes y otras sustancias antibacterianas.

Mantener los frascos a 37°C.

Lo establecido es la relación de 3 hemocultivos por paciente, previos a la instauración del tratamiento microbiano.

El intervalo entre las extracciones deben ser a una hora siempre que sea posible, pero puede acortarse hasta 15 minutos si es urgente comenzará con el tratamiento (meningitis). En caso de sepsis y endocarditis subaguda las extracciones se reparten en 24 horas. Si el paciente está en tratamiento antibiótico deben obtenerse 6 muestras en 48 horas y recomendable realizar las extracciones antes de la administración de la dosis correspondiente de antibióticos.

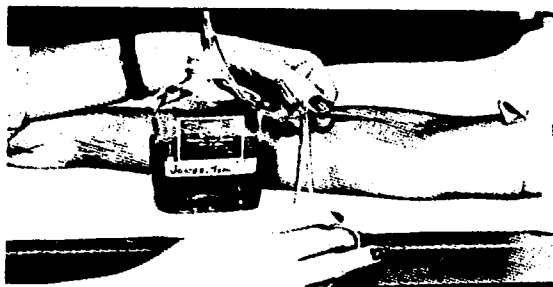
FIGURA No. 7**TÉCNICA DE VENOPUNCION PARA HEMOCULTIVOS**

Técnica de venopunción para obtener sangre para hemocultivos usando. Una aguja y jeringa estériles. Se aplica un torniquete en el brazo por encima del sitio de venopunción para distender las venas de la cara anterior del brazo. El sitio se prepara con tintura de yodo y alcohol.

La sangre se extrae con la aguja y jeringa y se inyecta en un frasco apropiado para hemocultivo. Con el fin de reducir la posibilidad de contaminación cutánea, se aconseja usar una segunda jeringa para extraer la sangre para el cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA No. 8
SISTEMA CERRADO DE RECOLECCION DE SANGRE PARA HEMOCULTIVOS



Sistema cerrado de recolección de sangre para hemocultivo. Consiste en un frasco al vacío y un catéter con dos agujas. Primero se clampea el catéter con un hemostato y se coloca una aguja en el tapón del frasco. La otra aguja se usa para la venopunción. Se coloca un torniquete por encima del sitio de venopunción. Cuando la aguja entra en la vena, se suelta el hemostato y la sangre es aspirada directamente hacia el frasco. El vacío está regulado de forma tal que se extraen exactamente 10 ml. , de sangre.

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se aislen e identifiquen las bacterias presentes en sangre, *como*, por medio de una buena toma de muestra, cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas primarias y secundarias y determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos por medio de la técnica de MIC, *para* conocer el agente etiológico y sugerir un tratamiento.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. *Que* se obtenga y se lleve a cabo una buena toma de muestra (sangre), *como*, por medio de una punción venosa *para* llevar a cabo su cultivo.
2. *Que* se incube la sangre por 30 días, *como*, colocándola en frascos de hemocultivo, *para* favorecer el posible crecimiento bacteriano.
3. *Que* se detecte crecimiento bacteriano, *como*, determinando en el frasco de hemocultivo características físicas, producción de bióxido de carbono, utilizando indicadores y un frotis directo, *para* detectar el microorganismo responsable (Gram +, Gram - o baciloco) y posteriormente sembrar en medios de cultivo.
4. *Que* se siembre de los frascos con crecimiento positivo, *como*, en medios de cultivo adecuados de acuerdo al microorganismo observado en el Gram en medios rico (agar sangre, agar chocolate) y un medio diferencial o selectivo (cetrimida, Sales manitol, Mac Conkey, Agar sangre+suero+dextrosa) *para* posteriormente identificar al microorganismo involucrado en el problema por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias.
5. *Que* se realice prueba de sensibilidad a los antimicrobianos a la bacteria identificada, *como*, por la técnica de MIC, para sugerir un tratamiento. Para Gram (-) o Gram (+).

MATERIAL**Medios de cultivo en caja**

Por equipo

Agar sangre	1
Agar chocolate	1
Agar Mac Conkey	1
Agar sales manitol	1
Agar Biggy	1
Agar Cetrimida	1
Agar soya tripticaseína	3

Medios de cultivo en tubo

Por equipo

Caldo soya tripticaseína	1
Arginina, lisina, ornitina	1 c/u
Medio malonato	1
Medio urea	1
Rojo de metilo	1
Voges Proskauer	1
SIM	1
Nitratos	1
Hidrólisis de hipurato	1
Medio o/f	2
Medio citratos	1

Material biológico

Sangre de carnero

Plasma

Suero descomplementado

Botellas de hemocultivo obtenidas de hospitales

Reactivos

Aceite mineral estéril
Aceite de inmersión
Glicerol
Rojo de metilo
Alfa naftol 5%
Hidróxido de potasio 40%
Reactivo de Ehrlich o Kovac's
Alfa naftilamina
Acido sulfanilico
Zinc metálico
Cloruro férrico
Cristal violeta
Lugol
Alcohol acetona
Safranina
Peróxido de hidrógeno 30%
N-N-tetrametilparafenilendiamina
Agua destilada estéril
Tubos con solución salina fisiológica estéril

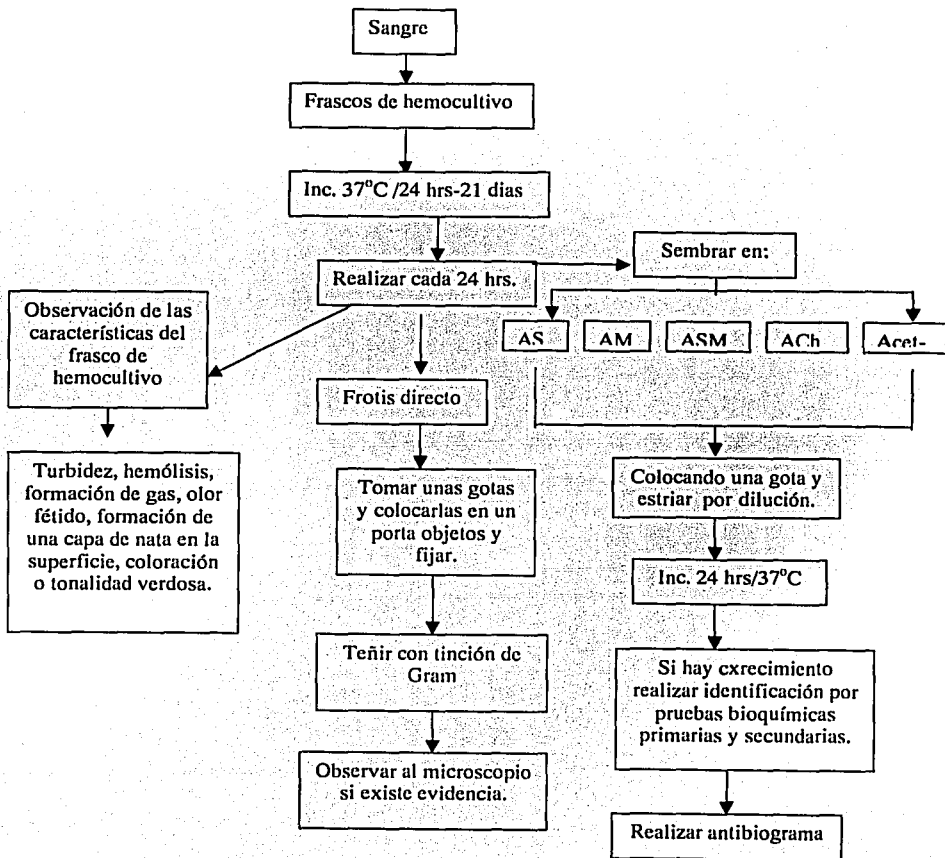
Otros

Pipetas de 1 y 5 ml
Pipetas de 5 ml
Jeringas de 5 ml.
Palillos estériles
Asa bacteriológica
Tubos estériles
Mecheros
Porta y cubre objetos.

Equipo

Autoclav
Microscopio óptico
Microscopio estereoscópico
estufa
Jarra Gas-Pak

DIAGRAMA DE TRABAJO (Para hemocultivo normal)



HOJA DE RESULTADOS**EQUIPO:****FECHA:**

PRUEBAS REALIZADAS	M.o. problema.
INDOL	
ROJO DE METILO	
VOGES-PROSKAUER	
CITRATO	
AC. SULFHÍDRICO	
LISINA	
ARGININA	
ORNITINA	
MOTILIDAD	
MALONATOS	
OXIDO-FERMENTACION	
LACTOSA	
MANITOL	
SALICIM	
MALTOSA	
XILOSA	
NITRATOS	
MANOSA	
FRUCTUOSA	
NITRATOS	
UREA	
OXIDASA	
CATALASA	
COAGULASA	
HIDRÓLISIS DE HIPURATO	
TINCIÓN DE GRAM	
NOVOBIOCINA	

M.o. Identificado:

Ver tablas de identificación.

HOJA DE RESULTADOS.**ANTIBIOGRAMA**

<i>SENSIDISCO</i>	<i>S(sensible)</i>	<i>R(Resistente)</i>	<i>I(Intermedio)</i>
<i>Amikacina</i>			
<i>Gentamicina</i>			
<i>Amoxicilina-Ac. Clavulánico</i>			
<i>Ampicilina</i>			
<i>Sulfametoxazol-Trimetoprim</i>			
<i>Cefazidima</i>			
<i>Penicilina</i>			
<i>Doxicilina</i>			
<i>Ampicilina</i>			
<i>Clindamicina</i>			
<i>Eritromicina</i>			

Ver anexo para obtener resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Alejandro Ramirez. Brucelosis. Revisiones bibliográficas para el Médico. Julio 1999. Vol. 4 Num. 5 México, D.F. pp 294-303
2. A.Ruth Foxwell. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and prevention. Microbiology and molecular biology reviews. June 1998. Vol. 2. No. 2. Pp 3054-3061.
3. Douglas A. Drevets. *Listeria monocytogenes* Infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. Infection and immunity. Nov. 1995. Vol. 63. No. 11. Pp 4268-4275
4. G.J. Jansen. Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently labeled oligonucleotide probes. Journal of clinical Microbiology. Feb. 2000. Pp 814-817.
5. G. Martinez de Tejada. The outer Membranes of *Brucella spp* are Resistant to Bactericidal cationic peptides. Infection and Immunity. 1995. Vol. 63. No. 8. Pp 3054-3061.
6. Hernández Monroy. Brucelosis. Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR. Sección de salud. Publicación técnica del INDRE No. 19. México, D.F. 1996.
7. Hospital Practice. Clinical Experience *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Septiembre 1996. Vol. 15.
8. J.A. Garcia Rodriguez. Indicaciones de los hemocultivos. Aspectos prácticos del manejo de los hemocultivos. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario. Univ. Salamanca, España. Medicina. 1998. Vol. 7. No. 73. Pp 3401-3404.
9. K. Hosein Lan. El laboratorio de microbiología. Infectología. 1990. No. 2. Febrero. pp 112-119.

10. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. 3ª. Edición. 1992. España.
11. Larry G. Reimer. Update on Detection of Bacteremia and fungemia. Clinical Microbiology Reviews. July. 1997. Vol. 10. Num. 3. Pp. 444-465.
12. M.C. Fariñas. Bacteremia y sepsis. Aspectos etiológicos y patogénicos. Clínica y diagnóstico. Medicine. 1998. Vol. 7. No.73. pp 1463-1469.
13. Microbiology for the Health sciences. Edit. J.B. Lippincot company. 4ª. Edición. 1991. Philadelphia, Pennsylvania. Pp 172-335.
14. Rodríguez Zapata. Brucellosis. Aspectos patogénicos. Clínica Diagnóstico y Tratamiento. Formas específicas de enfermedad. Medicine. 1997. Vol. 7. Num. 79. España.
15. Pedroza Barajas Ma. Elena. Indicaciones clínicas y microbiológicas del hemocultivo. Infectología. 1994. No. 10 Octubre. Pp 393-397.
16. Robbin A. Ross. Regulation of cell Component production by Growth Rate in the Group B *Streptococcus*. Journal of Bacteriology. Octubre. 1999. Vol. 81. Num. 17. Pp 5389-5394.
17. Zuhayr A. Tabbarah. Thermodissociation of staphylococcal Immune complexes and detection of staphylococcal antigen in serum from patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Journal of Clinical Microbiology. June. 1989. Vol. 11. Num. 6. Pp 703-709.

SECRECIÓN DE HERIDAS

Introducción:

Las infecciones en heridas son característicamente polimicrobianas.

Las infecciones de las cuales se obtienen muestras de heridas y abscesos pueden ser exógenas o endógenas. Las exógenas incluyen las asociadas con heridas traumáticas, heridas o úlceras por decúbito, mordeduras de animales o humanos, quemaduras o cuerpos extraños en la piel o mucosas. Estas lesiones con frecuencia son colonizadas por bacterias ambientales y los hisopados a menudo no reflejan la verdadera causa del proceso infeccioso^(5,8)

Las heridas y abscesos endógenos pueden asociarse con apendicitis, colecistitis, celulitis, infecciones dentales, osteomielitis, empiema, artritis séptica, sinucitis o muchas otras infecciones internas. Gran número de éstas infecciones son secundarias a procedimientos invasivos, manipulaciones quirúrgicas o colocación de prótesis. Otras ocurren por diseminación hematógena desde sitios primarios de infección o por extensión directa de contaminantes bacterianos en presencia de vísceras rotas, en particular el intestino grueso.

Por lo general son causadas por bacterias anaerobias, cuando se recogen las muestras se debe tener cuidado de asegurar que éstas sean mantenidas en condiciones anaerobias durante el transporte^(1,4,3)

Los microorganismos de las heridas reflejan su localización anatómica, la forma en que se las infligió (quirúrgica o traumática), el medio en que se produjeron y el grado de contaminación microbiana de las áreas adyacentes perforadas en el proceso. Estas consideraciones son complementarias de las de orden general que mantienen un adecuado equilibrio huésped-parásito, pero no las sustituyen. Las heridas traumáticas se complican comúnmente con microorganismos nativos aerobios, especialmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo A y D *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacterias, Flavobacterias y *Acinetobacter* spp.

Entre las bacterias anaerobias asociadas a heridas traumáticas, predominan los clostridios histotóxicos y neurotóxicos que en condiciones favorables pueden llevar a la gangrena gaseosa o tétanos. Los clostridios asociados a la gangrena gaseosa son *Clostridium perfringes* tipo A, *Clostridium septicum* y *Clostridium novyii*. El diagnóstico de gangrena gaseosa es estrictamente clínico, el aislamiento de clostridios puede alertar al clínico; pero no constituye un diagnóstico de celulitis ni de mionecrosis clostridiales. *Clostridium tetani* no debe de ser un problema en una población debidamente inmunizada.

Las heridas infligidas con arma blanca, no sólo requieren una intervención quirúrgica experta sino también atención microbiológica exhaustiva^(2,4,7)

Las infecciones que dificultan la cirugía pueden ser de dos clases. Una, la llamada infección por heridas, indica por lo regular una complicación de una técnica quirúrgica limpia, llevado a cabo en las mejores condiciones posibles de asepsia en tejidos generalmente estériles y no visiblemente contaminados durante la intervención quirúrgica, dicho evento puede ser por *Staphylococcus aureus*, enterococos o bacilos Gram negativos y actualmente se ven pocas veces *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, corinebacterias, neumococos, etc. Otra, cuando el cirujano realiza toda su tarea o parte de ella en un área no aséptica, con un determinado porcentaje de alteraciones infecciosas que a menudo reflejan el estado de salud del paciente. Entre las bacterias figuran *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus* spp, el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, *Providencia* spp, flavobacterias, *Acinetobacter* y *Bacteroides* spp^(6,1,3)

La contaminación microbiana de las quemaduras graves puede ser un riesgo mortal. El microorganismo más común y más difícil de eliminar es *Pseudomonas aeruginosa*, a menudo junto con flavobacterias y otros bacilos gram negativos, *Staphylococcus* que abundan en el medio o en la piel no afectada del paciente. El análisis microbiológico temprano de las quemaduras muestra generalmente gran número de variados microorganismos, muchos eventualmente complementados por las bacterias anteriormente citadas^(8,2)

Toma de muestra:

El método más deseable para recolectar muestras cutáneas de lesiones pustulosas o vesiculares consiste en aspirar el líquido o pus de la profundidad de la herida con una aguja y jeringa estériles. Primero debe descontaminarse el sitio con jabón quirúrgico y un antiséptico suave. La misma jeringa correctamente cerrada puede usarse como envase transportador; sin embargo, si se prevé una demora del procesamiento de más de 30 minutos, la muestra debe transferirse a un envase anaerobio.

Si es difícil obtener material con aguja y jeringa, debe usarse un hisopo y en ocasiones es necesario separar los márgenes cutáneos adyacentes. El hisopo debe colocarse de inmediato en un envase para transporte apropiado (anaerobio) o inocularse directamente en medios de cultivo para anaerobios, según circunstancias.

El tejido obtenido por debridación o biopsias puede ser una fuente de información para las infecciones. Como el riesgo de contaminar la muestra con la flora normal y transitoria es muy grande, la recolección cuidadosa de la muestra es muy importante para el diagnóstico de laboratorio.

El material de un absceso no drenado anteriormente, debe de contener el o los agentes etiológicos de la enfermedad en la mayor parte de los casos. En cambio una herida abierta, úlcera o fístula se contamina a menudo con microorganismos cutáneos, de las mucosas o del medio ambiente.

OBJETIVOS DE UNIDAD.

Que se aislen e identifiquen las bacterias que ocasionan infecciones en heridas, **como**, por medio de una buena toma de muestra, cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas primarias y secundarias **para** conocer el agente etiológico.

OBJETIVOS DE OPERACIÓN.

1. **Que** se obtenga la muestra de una herida, **como**, aspirando el líquido o pus de la profundidad de la herida con la ayuda de una aguja y jeringa estériles, o bien con un hisopo, debridando la herida, **para** su siembra en los medios adecuados.
2. **Que** se siembre la muestra, **como**, en medios de cultivo de Tioglicolato Agar Sangre, A. Chocolate, Sales manitol, Mac Conkey, cetrimida, **para** obtener crecimiento de la posible flora bacteriana involucrada en el problema.
3. **Que** se identifique el género bacteriano, **como**, por medio de tinciones, (gram, y diferenciar si es G+ o G- y su morfología), catalasa, oxidasa, motilidad, óxido -fermentación de glucosa, **para** elegir las pruebas bioquímicas secundarias e identificar la especie.
4. **Que** se identifique la especie bacteriana, **como**, con pruebas bioquímicas secundarias, **para** dar un resultado de género y especie.

MATERIAL

Medios de cultivo en caja.

	Por equipo
Agar sangre	1
Agar chocolate	1
Agar sales manitol	1
Agar Mac Conkey	1
Agar cetrimida	1
Agar soya tripticascina	1

Medios de cultivo en tubo

	Por equipo
Caldo soya tripticascina	2
Lisina, ornitina, arginina, fenilalanina	1 c/u
Gelatina	1
Malonato	1
Medio de Stuart	1
Citrato	1
Rojo de metilo	1
Vogues Proskauer	1
KIA o TSI	1
SIM	1
Nitratos	1
Hidrólisis de hipurato	1
Medio de O/F	1

De los siguientes CHOs, se requiere 1 por equipo y 10 por grupo de cada uno: sorbitol, manitol, xilosa, manitol, glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, trealosa.

Reactivos

Aceite de inmersión
Aceite mineral estéril
Agua destilada estéril
Rojo de metilo
Alfa naftol 5%
Hidróxido de potasio 40%
Reactivo de Ehrlich o Kovac's
Alfa naftilamina
Acido sulfanilico
Zinc metálico
Cloruro férrico
Cristal violeta
Lugol
Alcohol acetona
Safranina
Peróxido de hidrógeno 30%
N-N-tetrametilparafenilendiamina

Otros

Pipetas de 1 ml. estériles
Pipetas de 5 ml. Estériles
Asa bacteriológica
Palillos estériles
Mecheros
Porta objetos
Cubre objetos
Papel filtro estéril

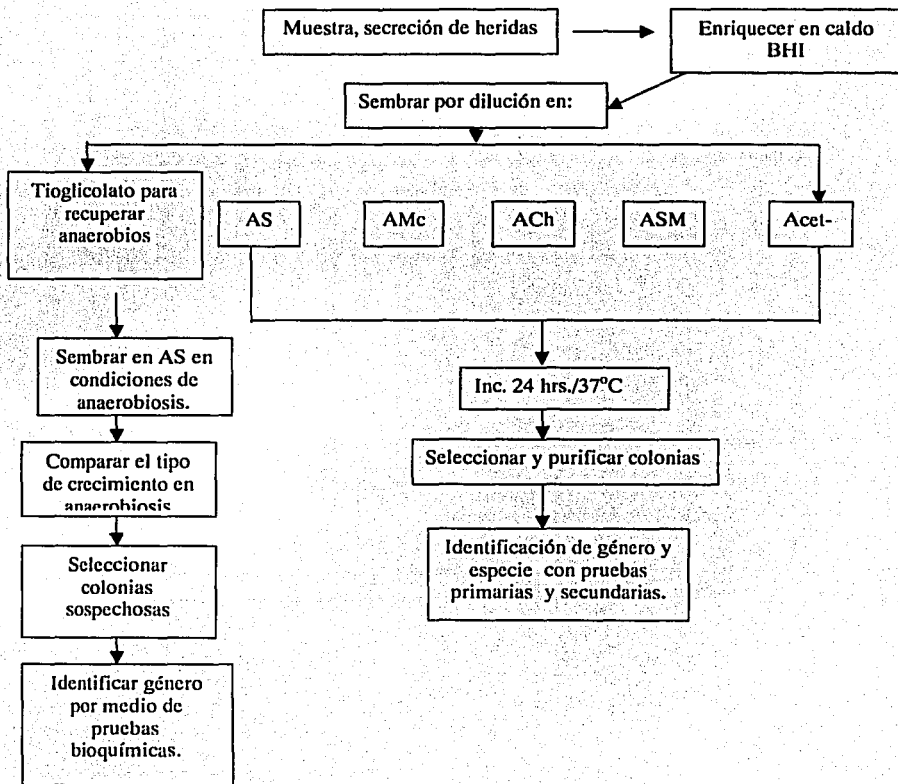
Material biológico

Sangre de carnero
Plasma
Suero descomplementado

Equipo

Microscopio óptico
Microscopio estereoscópico
Estufa
Baño mari

DIAGRAMA DE TRABAJO



HOJA DE RESULTADOS

EQUIPO:

FECHA:

PRUEBAS REALIZADAS	M.O. PROB. 1	M.O. PROB. 2	M.O. PROB. 3
INDOL			
ROJO DE METILO			
VOGES-PROSKAUER			
CITRATO			
TSI o KIA			
AC. SULFHIDRICO			
UREA			
φ-ALANINA			
LISINA			
ARGININA			
ORNITINA			
MOTILIDAD			
GELATINA			
MALONATO			
OXIDO-FERMENTACION			
MANITOL			
ADONITOL			
SORBITOL			
GLUCOSA			
SACAROSA			
MALTOSA			
XILOSA			
GALACTOSA			
TREALOSA			
NITRATO			
OXIDASA			
CATALASA			
TINCION DE GRAM			

M.o. Identificado:

Ver tablas de identificación.

BIBLIOGRAFIA

1. Bayley Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1997. Buenos Aires. Pp 295-301.
2. Balows Albert. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edición. Editorial American Society for Microbiology. 1995. Washington, D.D. pp 61-62 : 115-118.
3. John F. Kakai-kun. Deletion Analysis of the *Clostridium Perfringes* Enterotoxin. Infection and Immunity. Marzo (1997). American Society for Microbiology. Vol. 65. No. 3. Pittsburgh, Pennsylvania. Pp 1014-1022.
4. John T. Magee. Characterization of Smooth and Rough Morphotypes of *Peptostreptococcus micros*. International Journal of Sistematic Bacteriology. Abril (1998). Amsterdam, Holanda. Vol. 47. No. 2. Pp 363-367.
5. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. España.
6. Lennette Edwin. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1995. Buenos Aires. Pp. 128-135.
7. P.J. Van Dalen. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros*. Morphotypes and *Prevotella* species in pure and mixed culture. Journal Medica Microbiología. Vol. 47. Junio. 1998. Pp. 135-140.
8. Stevens. Dennis L. *Clostridial* Gas Gangrene: Evidence That α and θ Toxins Differentially Modulate the Immune Response and Induce Acute Tissue Necrosis. The Journal of Infections Diseases. 1997. Chicago, Illinois. Pp. 1

DISCUSION

Para el diagnóstico bacteriológico se debe seguir un programa bien definido de procedimiento y control de calidad con la finalidad de asegurar un buen resultado en el estudio microbiológico en cada una de las técnicas a trabajar y establecer los estándares necesarios para satisfacer los requerimientos de cada enfermo.

El personal de bacteriología tiene la última responsabilidad para asegurar que una técnica estandarizada sea seguida cada vez que llega un nuevo paciente y que los procedimientos sean llevados a cabo adecuadamente.

Es de suma importancia conocer las técnicas comúnmente utilizadas para la identificación bacteriana y lograr llegar a un buen diagnóstico.

Un factor importante que produce errores en el Diagnóstico Bacteriológico es sin duda la modificación o alteración de la toma de muestra así como omitir pasos en el diagrama de trabajo ya estandarizado.

Aunque suele ser imposible prever y evitar las contaminaciones ambientales (estufa y refrigerador) que alteran la pureza de los medios de cultivo antes y después de ser inoculados se puede reducir a un mínimo su ocurrencia, tomando las debidas precauciones. Las estufas y refrigeradores están sucios porque no existe un programa de mantenimiento y limpieza y no porque sea común la contaminación.

El bacteriólogo puede sugerir al médico un Diagnóstico y un Tratamiento , por medio de un antibiograma para los pacientes que así lo requieran o sean pedidos.

En la preparación de los medios así como en el proceso de sembrado y manejo de las muestras el bacteriólogo debe realizar buenos procedimientos asepticos y profesionales para disminuir el riesgo de contaminación y evitar dar malos resultados en el diagnóstico.

CONCLUSIONES

1. Al proporcionar al estudiante de Bacteriología Diagnóstica una introducción práctica a la identificación en el laboratorio de los agentes microbianos asociados con enfermedades infecciosas de tipo bacteriano se favorece el aprendizaje y se amplía su conocimiento en el área microbiológica.
2. Los alumnos al término del semestre salen con una visión más amplia sobre los diversos enfoques en el laboratorio de Bacteriología para proporcionar a los médicos resultados oportunos y determinar un diagnóstico y tratamiento enfocado principalmente a aquellas muestras de origen humano.
3. Mediante una revisión bibliográfica y la práctica se conocieron los patrones que afectan para obtener un buen diagnóstico bacteriológico y la forma adecuada de una toma de muestra.
4. Entre los principales factores que afectan este tipo de diagnóstico se encuentran: la mala toma de muestra, falta de control de calidad y un programa de control ambiental en el laboratorio al inocular los medios y trabajar las muestras, mala elección, manejo y preparación de los medios de cultivo.
5. Se recomienda que todo el personal del equipo de salud que se encuentre involucrado en un diagnóstico bacteriológico desde el tiempo de la preparación de los medios y material hasta el momento mismo de su utilización y reporte de resultados, cuente con los conocimientos necesarios, la capacitación y responsabilidades necesarios para este tipo de análisis, pues cualquier omisión o error en las consideraciones antes mencionadas pueden causar errores significativos para dar un buen resultado en el diagnóstico y tratamiento de los microorganismos encontrados.

1. Los objetivos planteados inicialmente se cumplieron satisfactoriamente, ya que se le proporcionaron al alumno toda una gama de herramientas para llevar a cabo un buen diagnóstico bacteriológico, así como tener las técnicas de rutina de los análisis más comunes.
2. El presente trabajo servirá a los alumnos que cursan la materia de Bacteriología Diagnóstica, así como a todas aquellas personas que están involucradas en el diagnóstico microbiológico, ya que posee diagramas de trabajo, técnicas y tablas de identificación de los microorganismos patógenos más comunes que afectan al ser humano.
3. El manual fue elaborado en base a los insumos con que cuenta el laboratorio y en ciertas partes están limitadas las técnicas por el mismo motivo.

ANEXO No. 1

TINCIONES BACTERIOLOGICASPARA OBSERVACION DE LA CAPSULA:

Tinción negativa: Se coloca una gota de tinta china y una asada del microorganismo en cuestión, se extiende sobre el portaobjetos, se deja secar y se observa al microscopio.

No tiñe el objeto. Tinta china: si la bacteria está rodeada totalmente por la tinta entonces no hay cápsula y si hay un espacio entre la bacteria y la tinta entonces esto quiere decir hay presencia de cápsula, por que la tinta china tiene carga negativa al igual que la cápsula.

Bacterias capsuladas: Se vislumbra el cuerpo bacteriano oscuro y alrededor de ésta se ve un espacio translúcido en donde no penetra el colorante, por la presencia de la cápsula.

TINCION DE GRAM:

Colocar una gota de agua destilada estéril en un porta objetos y hacer un frotis con una muestra de bacteria (tocando la colonia con el asa).

Secar al medio ambiente.

Fijar al calor del mechero.

Agregar cristal violeta por 1 minuto.

Lavar al chorro del agua.

Agregar lugol por 30 segundos.

Decantar

Decolorar con alcohol.-acetona 15 segundos.

Enjuagar al chorro del agua.

Agregar safranina por 1 minuto.

Enjuagar al chorro del agua.

Secar y observar al microscopio

Gram positivas (se tiñen de azul o morado)

Gram negativas (se tiñen de rojo o rosa)

TINCION DE ACIDO ALCOHOL RESISTENTES:**Ziehl-Neelsen:**

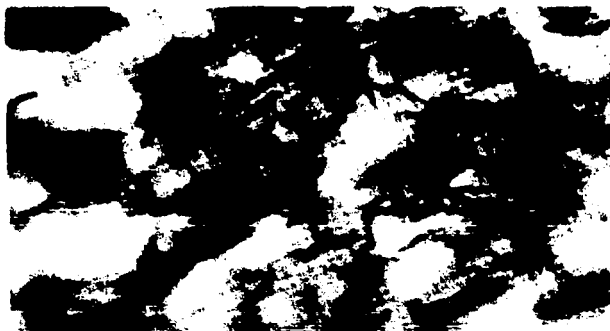
1. Realizar frotis sobre un porta objetos.
2. Cubrir el frotis seco, fijar por calor o (metanol tibio en caso de muestras clinicas), con un pequeño rectángulo de papel filtro.
3. Aplicar de 5-7 gotas de carbolfucsina para mojar completamente el papel filtro.
4. Panar la flama por debajo del portaobjetos cubierto con la solución hasta que se evapore pero sin dejar secar.
5. Quitar el papel con una pinza, enjuagar con agua y dejar secar.
6. Decolorar con alcohol-ácido hasta que no aparezca colorante en el lavado (2 minutos aprox.)
7. Agregar el azul de metileno (1 a 2 minutos)
8. Enjuagar, escurrir y secar al aire (1 a 2 minutos)
9. Examinar con un objetivo de inmersión 100x.

*Las mycobacterias se tiñen de rojo y el fondo de azul celeste.

TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kinyoun: Método modificado de Ziehl-Neelsen

- Hacer frotis, y fijar.
- Cubrir el frotis con Fucsina fenicada 3 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con ácido sulfúrico 1%, hasta que ya no corra el colorante
- Lavar
- Contrastar con azul de metileno 30"
- Lavar, secar y observar



FALLA DE ORIGEN

ANEXO No. 2

**CLASIFICACION DE NIVELES DE AIRE LIMPIO EN AREAS ASEPTICAS PARA LA
FABRICACION DE PRODUCTOS ESTERILES.**

CLASIFICACION	0.5 µm	0.5 µm	UFC Al cubico (UFC)
Clase 100	3530*	Cero	<3
Clase 1000	35300*	247*	-
Clase 10000	353000*	2470*	<20
Clase 100000	3530000*	24700*	<100

*Número Máximo de Partículas permitidas por metro cúbico.

LIMITES MICROBIANOS DE AIRE Y SUPERFICIE EN BASE AL <1116>

Nivel de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el aire.

Clase	UFC por metro cúbico de aire	Exposición 30 min UFC cada metro
100	Menor de 3	1
10,000	Menor de 20	10
100,000	Menor de 100	15

*Definid en el Federal Standard 209E, September 1992.

**Volumen suficiente de aire que debe ser muestreado para producir resultados finitos.

Nivel de UFC para Superficies de Equipos e Instalaciones.

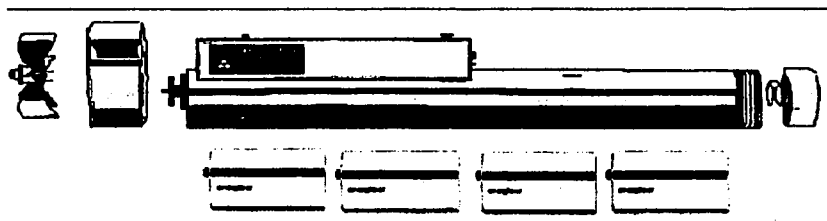
Clase	UFC por placa de contacto
100	3
10,000	5
100,000	10

*Placa de contacto variable entre 24-30 centímetros cuadrados. Cuando se utilice el hisopo debe cubrirse un área mayor a 24 cm cuadrados pero menor a 30 cm cuadrados.

Nivel de UFC en Superficies del Uniforme del Operador.

Clase	UFC por placa de contacto	
	Guantes	Cubre bocas/botas/traje
100	3	5
10,000	20	10

Placa de contacto variable entre 24 a 30 centímetros cuadrados. Cuando se utiliza un hisopo debe cubrirse un área mayor a 24 cm cuadrados pero menor a 30 cm cuadrados.(5)

ANEXO No. 3**BIOTEST RCS.**

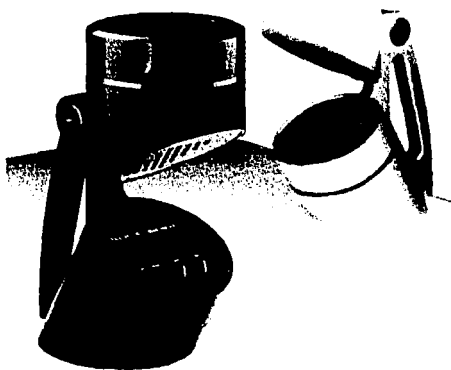
Existen dos tipos de Biotest: el RCS y el RCS Plus. Ambos utilizan el mismo principio.

El RCS es el más sencillo, su control del tiempo de muestreo se controla por medio de botones en intervalos que van desde 30 segundos hasta 8 minutos, ofreciendo una capacidad de análisis de 20 a 320 litros, a una velocidad de 40 litros de aire por minuto.

El equipo utilizado debe ser calibrado y verificado de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Eficiencia de las baterías
- Angulo de las aspas del abanico
- Tiempo de muestreo.

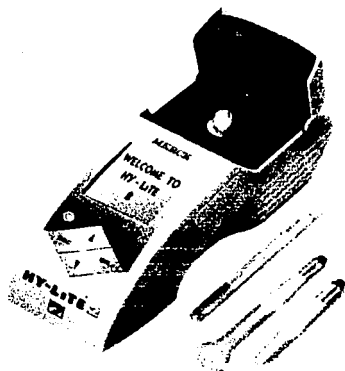
El equipo RCS plus, es más novedoso. Tiene capacidad de almacenar un total de 10 volúmenes de muestreo diferentes. Presenta 7 memorias preestablecidas cuyos valores son: 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 litros en orden ascendente. Las tres memorias restantes quedan disponibles para las necesidades de cada empresa y pueden ser desde 1 a 999 litros. Tiene una velocidad aproximada de 54 litros de aire por minuto. Tiene alarma sonora para indicar que se ha terminado el muestreo.

ANEXO No. 4MAS 100 (Merck Air Sampler 100).

El MAS 100 es un equipo de monitoreo de ambiente para detección de carga microbiana en áreas estériles y puntos críticos. El MAS 100 genera una corriente de aire que será succionada y que servirá de transporte para los diversos microorganismos existentes en el área muestreada. Dichos microorganismos impactarán sobre una superficie de agar, rica en nutrientes, que permitirá el crecimiento de los microorganismos succionados y su posterior lectura en UFC . La concentración de microorganismos de dichos ambientes, deberá ser reportada por UFC por litros de aire succionados.

ANEXO No. 5

SISTEMAS PARA MONITOREO DE SUPERFICIES



HY - LITE +2

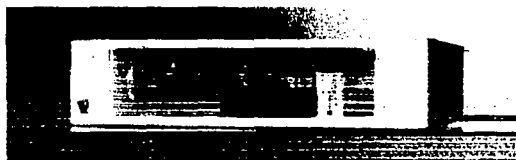


ENVIROCHECK RODAC PLATES.

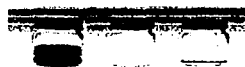
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO No. 6
READYCULT.



Interpretation of results



Positive
1. Visible
change to
blue/green.

**Presence
of Total
Coliforms**

Negative
1. Visible
change to
blue/green.

**No
Coliforms**



Positive
1. Visible change to blue/green
2. Fluorescence in 2 indole

**Presence
of
E.coli**

Prueba rápida para la determinación de presencia/ausencia de coliformes totales y E. Coli en 18-24 hrs., en agua de consumo humano o de proceso (El método tradicional tarda 72 hrs., para la determinación de E. Coli)

La determinación de presencia /ausencia de estos m.p., se lleva a cabo mediante dos reacciones enzimáticas. La primera reacción con el sustrato cromogénico X-galactosidasa genera una coloración azul ante la presencia de coliformes totales. La segunda reacción con el sustrato MUG genera una fluorescencia al leer bajo luz ultravioleta. Ambas reacciones tienen un grado de certidumbre de 97-99%. Dicha certidumbre puede ser aumentada por la reacción de Indol con el reactivo de Kovac's.

ANEXO No. 7**NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS****Tubos inoculados: 3 con 10 ml de la muestra (serie 1)****3 con 1 ml de la muestra (serie 2)****3 con 0.1ml de la muestra (serie 3)**

No. Tubos positivos			NMP (100 ml)	Límites de confianza (95%)	
3 10 ml	3 1ml	3 0.1 ml		Mínimo	Máximo
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	100
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	3	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

(10)

Ejemplo:

Serie 1 (3) Serie 2 (1) Serie 3 (0) R= 43NMP/100 ml.

ANEXO No. 8.**HOJA DE RESULTADOS ESPERADOS EN CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO.**

Medio de cultivo	Esterilidad	Promoción de Crecimiento	Inhibición Crecimiento	Microorganismo	Respuesta Bioquímica
AGAR SANGRE	+	+		<i>Streptococcus pyogenes</i> Grupo A	Colonias pequeñas claras con β -hemólisis en 24
	+	+		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colonias grandes y blancas con α -hemólisis en 24 hrs.
	+	+		<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias grandes y blancas con β -hemólisis en 24 hrs.
AGAR CHOCO LATE	+	+		<i>Haemophilus influenzae</i> tipo	Colonias pequeñas en forma de rocío bien definidas en 24 hrs, en presencia de CO ₂
	+	+		<i>Neisseria meningitidis</i>	Colonias planas con tonalidad verdosa en 24 hrs., en presencia de CO ₂
	±	+		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colonias grandes y blancas, con α -hemólisis en 24 hrs., en presencia de CO ₂
AGAR BRODA CIN				<i>Escherichia coli</i>	Colonias amarillas grandes, con borde estrellado, con cambio del medio.
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonias blancas grandes, con borde estrellado, sin cambio del medio.
				<i>Candida albicans</i>	Colonias blancas
AGAR EMB				<i>Escherichia coli</i>	Colonias amarillas grandes y el medio sin cambio
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonias rosadas grandes y el medio sin cambio
				<i>Staphylococcus aureus</i>	No crecimiento.

Medio de cultivo	Esterilidad	Promoción de Crecimiento	Inhibición de crecimiento	Microorganismo	Respuesta Biológica
AGAR VERDE BRILANTE	+	+	-	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC	Colonias amarillas grandes y el medio sin cambio.
	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	Colonias rosadas grandes y el medio sin cambio.
	+	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC.	No cambio.
AGAR SALES MANITOL	+	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC.	Cto de colonias regulares y blancas con brillo, vire del medio rosa a amarillo.
	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC.	No crecimiento.
	+	-	+	<i>Escherichia coli</i> ATCC.	No crecimiento.
AGAR MUELLER HINTON	+	+		<i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC. <i>Escherichia coli</i> ATCC.	Se realizaron antibiogramas.

Esterilidad: (+) No contaminado; (-) Contaminado.

Promoción de crecimiento: (+) Desarrollo del m.o.; (-) No desarrollo del m.o.

Inhibición de crecimiento: (+) No desarrollo del m.o.; (-) Desarrollo del m.o.

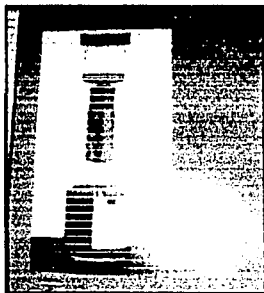
ANEXO No. 9.
TABLA DE LECTURA.

PRUEBAS	SUBSTRATOS	REACCIONES ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	Ortonitrofenolgalactósido	β -galactosidasa	Incoloro	Amarillo (1)
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa	Amarillo	Rojo/naranja (2)
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Naranja
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo/naranja (2)
CIT	Citrato sódico	Utilización del citrato	Verde pálido/amarillo	Azul verde/azul (3)
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	Incoloro/grisáceo	Depósito negro
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	
TDA	Triptofano	Triptófano desaminasa	<u>TDA/ INMEDIATO</u>	
IND	Triptofano	Producción del indol	Amarillo	Marrón oscuro
			JAMES/ INMEDIATO o IND / 2 min	JAMES
			Incoloro	Rosa
			verde claro/amarillo	IND
			Amarillo	Anillo rojo
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	VP 1 más VP 2 / 10 minutos	
			Incoloro	Rosado/rojo
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	No hay difusión pigmento negro	Difusión de pigmento negro.
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	sorbitol	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación (4)	Azul/azul verdoso	Amarillo
OX	Sobre papel filtro	Citocromo oxidasa	OX / 1-2 minutos	
			Incoloro	violeta
NO ₃	Tugo GLU	Producción de NO ₂	NIT 1 más NIT2/ 2-3 minutos	
			Amarillo	Rojo
			Zn	
NO ₂		Producción a gas N ₂	Rojo Amarillo	
MOB	API M o Microscopia	Movilidad	Inmóvil	Móvil
MCC	Medio Mac Conkey	Crecimiento	Ausencia	Presencia
OF	Glucosa (API OF)	Cerrado : Fermentación Abierto: Oxidación	Verde Verde	Amarillo Amarillo

- 1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo
- 2) Un color naranja después de 24 horas de incubación debe considerarse negativo
- 3) La lectura debe hacerse en la cúpula (anaerobiosis)

ANEXO NO. 10

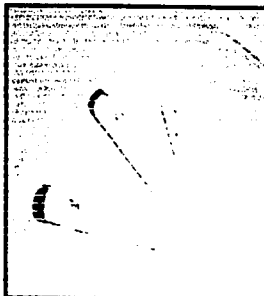
DIVERSOS FRASCOS PARA HEMOCULTIVO



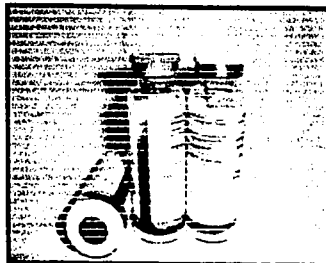
BOTELLA DE SISTEMA OXOID



BOTELLA DEL SISTEMA OPTICULT

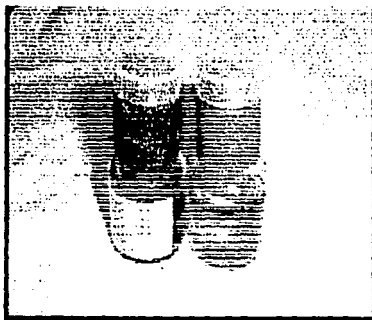


TUBO DE SISTEMA ISOLATOR

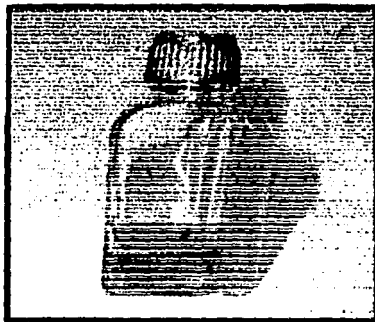


BOTELLA DE SISTEMA BACT/ALERT

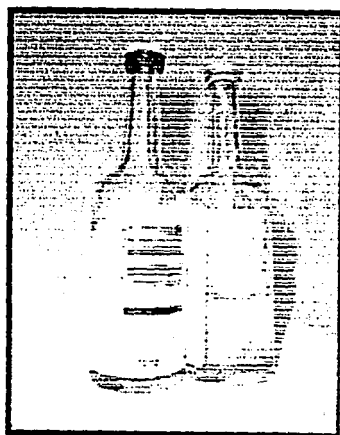
TESIS CON
FALSA ORIGIN



BOTELLA DEL SISTEMA SEPTI-CHECK



BOTELLA DE RUIZ CASTAÑEDA



BOTELLA DE SISTEMA BACTEC.

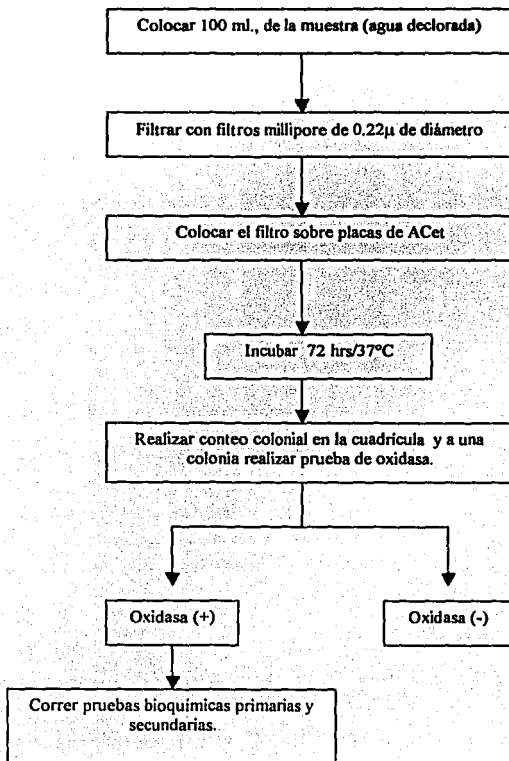
FILTRACIÓN DE MEMBRANA PARA PSEUDOMONAS

TABLA No. 1
TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA
***Staphylococcus* y *Micrococcus*.**

PRUEBAS	1	2	3	4	5
Crecimiento en condiciones anaerobias	+	W	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	d	-	-
Carbohidratos (formación de ácidos)	F	F	F	O	O
Glucosa	+	+	-	+	+
Lactosa	+	d	-	d	-
Maltosa	+	+	-	d	-
Manitol	+	d	-	d	-
Manitol (aeróbico)	+	-	-	-	-
Sucrosa	+	+	-	d	d
Xilosa	-	-	-	d	-
Voges Proskauer	-	d	-	-	-
Reducción de nitratos	+	d	-	d	+
Licuefacción de gelatina	+	d	d	d	-
Ureasa	+	d	d	+	d
Arginina hidrolasa	+	+	-	+	-
Fosfatasa	+	d	-	-	-
Coagulasa	+	-	-	-	-
1. <i>Staphylococcus aureus</i>					
2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>					
3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>					
4. <i>Micrococcus luteus</i>					
5. <i>Micrococcus fermentans</i>					
6. <i>Micrococcus varians</i> , <i>M. Lactis</i>					
7. <i>Micrococcus roseus</i>					
* Resultados muy variados en éste método.					
(d) Resultados dudosos.					

TABLA No. 2
TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA
Streptococcus

PRUEBAS													
Hemólisis													
Crecimiento a 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	d	-
Requerimiento de CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Crecimiento en 6.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en 10% de bilis	-	+	-	+	d	-	-	-	+	d	d	-	+
Crecimiento en 40% de bilis	-	+	-	-	-	-	-	-	d	d	d	-	d
Crecimiento en 1/4000 de telurito	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d	d	d	-
Carbohidratos (formación de ácido)													
Glicerol	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	d	d	d	-	+	-	+	+	+	+	d	+
Maltosa	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	d	d	d	-	d	d
Salicin	+	+	d	d	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Sorbitol	-	-	d	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealosa	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	d	d	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	d
Hidrólisis de esculina	-	-	-	d	-	+	-	-	-	+	d	d	-
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Hidrólisis de hipurato	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solubilidad en bilis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sensibilidad a bacitracina 0.04 U.I.	+	v	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Sensibilidad a optoquina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	8. <i>Streptococcus anginosus</i>												
2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	9. <i>Streptococcus pneumoniae</i>												
3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	10. <i>Streptococcus salivarius</i>												
4. <i>Streptococcus equisimilis</i>	11. <i>Streptococcus milleri</i>												
5. <i>Streptococcus equi</i>	12. <i>Streptococcus sanguis</i>												
6. <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	13. <i>Streptococcus mitior</i>												
7. <i>Streptococcus grupo E</i>	14. <i>Streptococcus mutans</i>												

TABLA No. 3**TABLA DE IDENTIFICACION PARA*****Corynebacterium* y *Listeria***

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Producción de gránulos metacromáticos	d	-	+	+	+	+	.	.	d	d	d	-	-	-
Hemólisis en agar sangre-suero	d	+	-	-	d	d	-	-	+	+	+	+	-	-
Utilización de carbohidratos en O/F	F	F	F	F	F	F	-	-	F	F	F	F	F	F
Producción de ácido a partir de:														
Glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	d	d	-	-	+	+	-	d	+	+
Maltosa	+	+	+	+	d	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Sucrosa	-	-	+	+	-	d	-	-	+	d	d	d	-	-
Trealosa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	+	d	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+
Licuefacción de gelatina	-	+	-	-	-	d	-	-	+	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	-	+	+	+	d	-	+	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	+	-	d	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de arginina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	8. <i>Corynebacterium hoffmannii</i>													
2. <i>Corynebacterium ulcerans</i>	9. <i>Corynebacterium haemolyticum</i>													
3. <i>Corynebacterium xerosis</i>	10. <i>Corynebacterium pyogenes</i>													
4. <i>Corynebacterium miturium</i>	11. <i>Corynebacterium vaginale</i>													
5. <i>Corynebacterium renale</i>	12. <i>Listeria monocytogenes</i>													
6. <i>Corynebacterium ovis</i>	13. <i>Listeria gravi</i>													
7. <i>Corynebacterium bovis</i>	14. <i>Listeria murrayi</i>													

TABLA No. 4.**TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA,
*Clostridium***

PRUEBAS	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esporas	UX	UX	TX	VX	VX	VX	VX	TX	TX	VX	UX	UX	VX	UVX	UVX	TY	TY	VX
Microaerofílico	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hemólisis	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+
Acido a partir de:																		
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sucrosa	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de NO ₃	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-b	+	+	+	+	-
Gelatina	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	w	+
Digestión (carne)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	-	d	+	
Acido sulfhídrico	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1. <i>Clostridium welchii</i> 2. <i>Clostridium butyricum</i> 3. <i>Clostridium tertium</i> 4. <i>Clostridium carnis</i> 5. <i>Clostridium fallax</i> 6. <i>Clostridium septicum</i> 7. <i>Clostridium chauvoei</i> 8. <i>Clostridium innocuum</i> 9. <i>Clostridium difficile</i>									10. <i>Clostridium oedematiens</i> 11. <i>Clostridium botulinum</i> 12. <i>Clostridium botulinum C,D,E</i> 13. <i>Clostridium sporogenes</i> 14. <i>Clostridium bifermentans</i> 15. <i>Clostridium sordellii</i> 16. <i>Clostridium tetanomorphum</i> 17. <i>Clostridium tetani</i> 18. <i>Clostridium histolyticum</i>									

TABLA No. 5

TABLA DE IDENTIFICACION PARA

Acinetobacter, *Moraxella*, *Brucella* y *Bordetella*.

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Producción de ácido en O/F	O	-	-	-	-	-	-	-	O	-a	-a	-a	.	.
Hemólisis	-/β	-/β	-	-	-	β	-	-	-β	-	-	-	.	.
Crecimiento a 42°C	+	+	-	D	-	-	d	+	-	-	-	-	.	.
Crecimiento en agar sangre	+	+	-	D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Requerimientos de suero	-	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.
Crecimiento en agar Mac Conkey	+	+	-	D	d	-	+	.	-	-	-	-	-	+
Citrato como fuente de carbono	+	d	-	D	w	-	-	d	-	-	-	-	-	d
Acido a partir de:														
Glucosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.
Lactosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.
Maltosa	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	.	.
Xilosa	+	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	+
Reducción de nitratos	-	-	+	d	d	d	+	-	d	+	+	+	.	.
Licuefacción de gelatina	d	-	+	-	-	+	-	-	d	-	-	-	.	.
Ureasa	d	-	-	-	d	-	+	-	-	+	+	+	.	+
φ-alanina	-	-	-	-	-	-	+	-	+
1. <i>Acinetobacter anitratus</i>	8. <i>Moraxella urethralis</i>													
2. <i>Acinetobacter iwoffii</i>	9. <i>Moraxella Kingii</i>													
3. <i>Moraxella lacunata</i>	10. <i>Brucella melitensis</i>													
4. <i>Moraxella nonliquefaciens</i>	11. <i>Brucella abortus</i>													
5. <i>Moraxella osloensis</i>	12. <i>Brucella suis</i>													
6. <i>Moraxella bovis</i>	13. <i>Bordetella pertussis</i>													
7. <i>Moraxella phenylpyruvica</i>	14. <i>Bordetella parapertussis</i>													

TABLA No. 6.
TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA:

Pseudomonas

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oxidasa	+	+	+	+	+	d	+	+	d	+	
Pigmento	+a	+b	.	+c	dd	+c	.	+c	-	-	
Fluorescencia en U.V.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	.	
Crecimiento a 5°C	-	+	d	-	-	-	d	-	-	.	
Crecimiento a 42°C	+	-	-	-	d	-	d	+	-	.	
Crecimiento en Mac Conkey	+	+	+	+	+	+	+	+	-	.	
Crecimiento en KCN	+	d	-	.	-	+	-	+	d	.	
Citrato como fuente de carbono	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
Acido a partir de:											
Glucosa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	
Lactosa	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	
Maltosa	-	-	d	-	+	+	d	+	d	-	
Manitol	+	+	d	-	+	-	d	+	+	-	
Salicil	-	-	.	.	+	-	-	-	-	-	
Sucrosa	-	d	-	-	+	-	-	+	d	-	
Xilosa	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	
Reducción de nitrato a nitrito	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	
Reducción de nitrato a gas	d	-	-	-	-	-	+	d	-	+	
Hidrólisis de gelatina	+	+	-	+	+	+	-	+	d	-	
Hidrólisis de caseína	+	+	-	+	+	+	-	+	.	.	
Ureasa	+	d	d	-	+	-	d	d	d	.	
Hidrólisis de arginina	+	+	+	-	-	-	d	+	+	-	
Descarboxilación de lisina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	.	
Descarboxilación de ornitina	-	-	-	-	d	-	-	-	-	.	
Hidrólisis de tween 80	+	d	-	-	+	-	+	+	d	+	
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 3. <i>Pseudomonas putida</i> 4. <i>Pseudomonas diminuta</i> 5. <i>Pseudomonas cepacia</i>						6. <i>Pseudomonas maltophilia</i> 7. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 8. <i>Pseudomonas pseudomallei</i> 9. <i>Pseudomonas mallei</i> 10. <i>Pseudomonas pickettii</i>					
Piocianina a Fluoresceína b Amarilla c											

TABLA No. 7

TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA

Vibrio, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Swarming	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37°C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Crecimiento a pH 9	+	+	+	+	.	-	d	-	.	.
Crecimientosin NaCl	-	-	-	-	-	+	+	+	.	.
Crecimientoen 6% NaCl	-	-	-	+	+	-	-	-	-	.
Crecimiento en medio KCN	d	d	d	+	.	+	-	-	+	d
Citrato como fuente de carbono	+	+	+	+	+	+	-	-	d	+
Acido a partir de:										
Glucosa	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	-	-	d	+	-	-	-
Sucrosa	+	+	+	-	+	+	-	d	d	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d
VP	-	+	d	-	+	d	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+	+	+	.	+	-	-	+	-
Hidrólisis de arginina	-	-	-	-	-	+	d	+	+	-
1. <i>Vibrio cholerae</i>	6. <i>Aeromonas hydrophila</i>									
2. <i>Vibrio Cholerae eltor</i>	7. <i>Plesiomonas shigelloides</i>									
3. <i>Vibrio spp</i>	8. <i>Aeromonas Salmonicida</i>									
4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9. <i>Chromobacterium violaceum</i>									
5. <i>Vibrio alginolyticus</i>	10. <i>Chromobacterium lividum</i>									

TABLA No. 8**TABLA DE IDENTIFICACION PARA*****Neisseria* y *Branhamella***

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en condic. aerobicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización de glucosa en O/F	O	O	i	O	O	.	-	-	-	-
Producción de pigmentos	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Hemólisis crecimiento a 22°C	-	-	+	+	+	+	+	w	w	w
Requerimiento de sangre y suero	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de ácido a partir de:										
Glucosa	+	+	-	+	+	d	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Maltosa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Sucrosa	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-	+	+	-	d	+	+
1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6. <i>Neisseria animalis</i>									
2. <i>Neisseria meningitidis</i>	7. <i>Neisseria elongata</i>									
3. <i>Neisseria flavescens</i>	8. <i>Branhamella catarrhalis</i>									
4. <i>Neisseria pharyngis</i>	9. <i>Branhamella caviae</i>									
5. <i>Neisseria mucosa</i>	10. <i>Branhamella ovis</i>									

TABLA No. 9
TABLA DE IDENTIFICACIÓN PARA
Mycobacterium

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Catalasa	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Pigmento en light	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Pigmento en dark	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Crecimiento < 3 días	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Crecimiento a 25°C	-	-	d	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 33°C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+
Crecimiento a 45°C	-	-	d	-	-	-	d	-	-	+	+	-	d
Crecimiento a 52°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento en Mac Conkey	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl 5%	-	-	-	-	-	+	-	-	d	+	+	-	-
Reducción de nitratos	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	d
Hidrólisis de tween	d	-	-	+	-	-	d	-	+	-	+	+	d
Producción de niacina	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

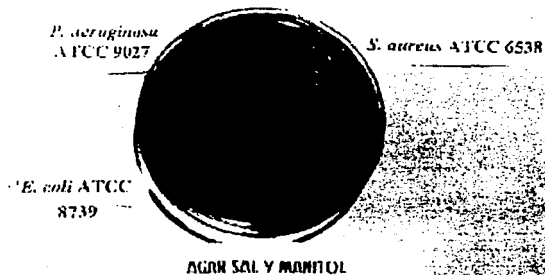
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7. <i>Mycobacterium ulcerans</i>
2. <i>Mycobacterium bovis</i>	8. <i>Mycobacterium marinum</i>
3. <i>Mycobacterium avium</i>	9. <i>Mycobacterium chelonae</i>
4. <i>Mycobacterium kansasii</i>	10. <i>Mycobacterium phlei</i>
5. <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	11. <i>Mycobacterium smegmatis</i>
6. <i>Mycobacterium fortuitum</i>	12. <i>Mycobacterium goodii</i>
	13. <i>Mycobacterium rhodochrous</i>

TABLA No. 10
TABLA DE IDENTIFICACION PARA
Haemophilus

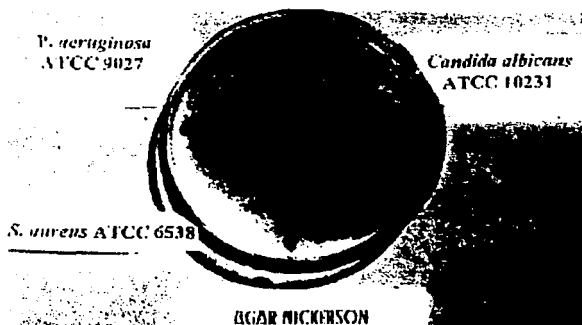
PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	-	-	+	-	-	-	-	-
Catalasa	+	v	+	-	-	v	+	+
Oxidasa	+	+	+	-	+	-	+	+
Prueba de porfirina	-	+	-	w	+	+	-	-
Requerimiento de factores:								
X (hemina)	+	-	+	-	-	-	+	+
V (NAD)	+	+	+	-	+	+	+	-
Producción de ácido a partir de:								
Glucosa	+	+	+	+	+	w	+	-
Fructosa	-	+	w	+	+	w	-	-
Sacarosa	-	+	-	+	+	w	-	-
Lactosa	-	-	-	+	+	-	-	-
manosa	-	+	-	+	+	-	-	-
1. <i>Haemophilus influenzae</i>	5. <i>Haemophilus paraphrophilus</i>							
2. <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	6. <i>Haemophilus segnis</i>							
3. <i>Haemophilus haemolyticus</i>	7. <i>Haemophilus aegyptus</i>							
4. <i>Haemophilus aphrophilus</i>	8. <i>Haemophilus ducrey</i>							

ANEXO No. 12

EJEMPLO DE CRECIMIENTO EN CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO.



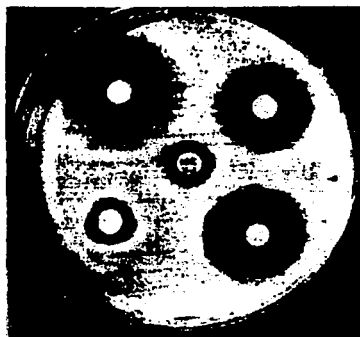
Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar
Sales Manitol con *Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa y *Escherichia coli*



Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar
Nickerson con *Candida albicans*,
Pseudomonas aeruginosa y *Escherichia coli*.

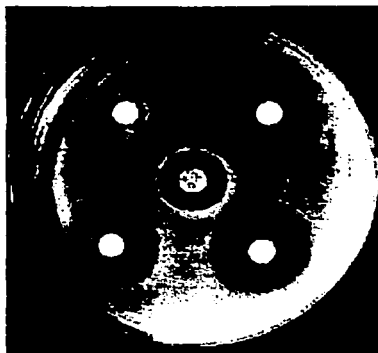
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Staphylococcus aureus ATCC 6538



AGAR MUELLER HINTON

E. coli ATCC 8739



AGAR MUELLER HINTON

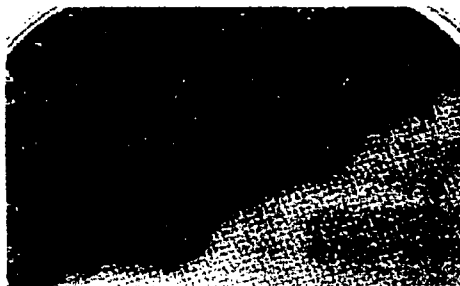
Ensayo de susceptibilidad de antibióticos en agar **Mueller-Hinton**. La zona de inhibición es el área donde no se observa crecimiento, ya que el antibiótico está presente en concentración inhibitoria para los m.o., susceptibles.

ANEXO No. 13CRECIMIENTO COLONIAL EN ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO

Crecimiento de *E.coli* en AXLD El aspecto amarillo del medio alrededor de las colonias indica utilización de lactosa o sacarosa (o ambas), porque se ha producido una caída suficiente en el pH por debajo del punto decisivo del indicador rojo de fenol.



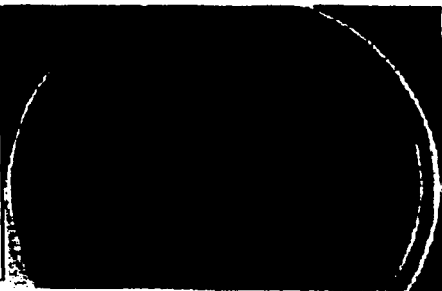
Superficie de AMc con colonias Lac(+) rojas. El difuso color rojo en el agar es producido por m.o., que fermentan ávidamente la lactosa produciendo gran cantidad de ácidos mixtos.



Superficie de AMc que ilustra colonias Lac(+) rojas y colonias más pequeñas, claras Lac (-)



Placa de AS que ilustra un patrón de *swarming* como ondas, altamente sugestivo de una cepa móvil de una especie de *Proteus*.



Placa de AEMB que ilustra el brillo verde metálico producido por miembros de las Enterobacterias Lac(+). Sugestivos de *E. Coli*



Placas de AEMB que ilustra un cultivo mixto de *E. Coli* (colonias c on brillo verde metálico) Lac (+) y especies de *Shigella* Lac (-). Colonias semitranslúcidas y no pigmentadas.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO No. 14
REFERENCIA DE ANTIBIOTICOS PARA ANTI BIOGRAMA

Antimicrobial Agent	Code	Dose Potency	Zone Diameter Interpretive Chart (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resist. test	Inter-mediate	Suscept. test	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27863	H. influenzae ATCC 49247C	N. meningitidis ATCC 49786D	S. pneumoniae ATCC 49619D	S. pneumoniae ATCC 49619D
Ampicillin	AMP-10	10 µg	≤ 15	16-17	≥ 18	23-29	—	—	—	—	—	—
Enfloxacin	AN-30	30 µg	—	—	—	15-28	20-26	18-28	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci			≤ 14	15-16	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Amoxicillin			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Clavulanic acid P.H.I.	AMC-30	20/10 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	15-24	28-36	—	—	—	—	—
Enrofloxacin			≤ 10	—	≥ 20	—	—	—	18-26	—	—	—
Staphylococcus spp.†			≤ 19	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Amoxicillin	AM-10	10 µg	≤ 13	14-17	≥ 17	18-22	27-35	—	—	—	—	—
Enfloxacin and V. cholerae††			≤ 28	—	≥ 28	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus spp.†			≤ 18	—	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus spp.†			≤ 19	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			≤ 18	19-21	≥ 22	—	—	10-21	—	—	—	30-38
Streptococcus (S. pneumoniae, β-hemolytic)‡			≤ 19	19-25	≥ 23	—	—	—	—	—	—	—
Ampicillin			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Subactam (S.P.)	SAM-20	10/10 µg	—	—	—	20-24	29-37	—	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci†			≤ 11	12-14	≥ 15	—	—	—	—	—	—	—
Acinetobacter spp.†			≤ 10	—	≥ 20	—	—	—	14-24	—	—	—
Aldicarb	AZV-15	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	—	21-26	—	—	—	—	—
Staphylococcus spp.†			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			—	—	—	—	—	—	13-21	—	—	—
S. pneumoniae and other Streptococci‡			≤ 13	14-17	≥ 18	—	—	—	—	—	—	19-25
Asoxil	AZ-75	75 µg	—	—	—	—	—	24-30	—	—	—	—
P. aeruginosa			≤ 17	—	≥ 18	—	—	—	—	—	—	—
Aztreonam	ATA-30	30 µg	≤ 15	10-21	≥ 22	28-36	23-31	25-30	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa & Acinetobacter, Klebsiella spp.†			≤ 10	—	≥ 20	—	—	—	30-38	—	—	—
Bactracin†	B-10	10 U	≤ 8	9-12	≥ 13	—	12-22	—	—	—	—	—
Carbamazepine	CB-100	100 µg	—	—	—	25-29	—	18-24	—	—	—	—
Enrofloxacin and Acinetobacter			≤ 10	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus spp.†			≤ 13	14-16	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Ceftazidime	CEC-30	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	23-27	27-31	—	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa and staphylococci†			≤ 10	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			≤ 10	12-15	≥ 16	—	—	—	—	—	—	—
Cefamandole	MA-30	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	28-33	28-34	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			≤ 14	—	≥ 18	—	—	—	—	—	—	—
Cefazolin	CFZ-30	30 µg	≤ 11	12-17	≥ 18	23-26	26-35	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cefixime	CFM-5	5 µg	—	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Enrofloxacin†			≤ 16	16-18	≥ 19	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			—	—	≥ 21	—	—	—	—	—	—	—
Acinetobacter‡			—	—	≥ 31	—	—	—	25-30	—	—	—
Cefmetazole	CMZ-30	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	26-31	28-34	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			≤ 12	—	≥ 23	—	—	—	—	—	—	—
M. gonorrhoeae‡			≤ 27	28-32	≥ 33	—	—	—	—	—	—	—
Cefonicid	CND-30	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	25-30	29-38	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			≤ 16	17-19	≥ 20	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cefoperazone	COP-75	75 µg	—	—	—	28-34	34-35	23-28	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci†			≤ 16	10-10	≥ 21	—	—	—	—	—	—	—
Cefuroxime	CFX-30	30 µg	—	—	—	21-26	26-31	18-22	—	—	—	—
Enrofloxacin, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci†			≤ 14	15-20	≥ 23	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus spp.‡			—	—	≥ 26	—	—	—	31-32	—	—	—
Staphylococcus spp.†			—	—	≥ 31	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus (S. pneumoniae)‡			≤ 25	26-28	≥ 29	—	—	—	—	—	—	—
Cefotaxime	CTX-30	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	24-28	17-23	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			≤ 19	20-25	≥ 26	—	—	—	—	—	—	—
M. gonorrhoeae‡			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cefotaxime	CTX-30	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	—	—	—	—	—	—	—
Enrofloxacin and staphylococci†			≤ 23	24-27	≥ 28	—	—	—	—	—	—	—
M. gonorrhoeae‡			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Antibiotic	Dose	Zone Diameter			Interpretive Standards (mm)				Control Zone Diameter limits (mm)			
		Resistant	Intermediate	Susceptible	E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	S. pneumoniae	M. luteus	M. niger	S. aureus	S. pneumoniae
Chloroquine ¹	10 µg	17-20	21-23	24-26	25-28	29-32	33-36	37-40	41-44	45-48	49-52	53-56
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>N. gonorrhoeae</i> ¹												
Clarithromycin ¹	15 µg	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40	41-43	44-46
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Clindamycin ¹	2 µg	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40	41-43	44-46
<i>Staphylococcus spp.</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Colistin ¹	10 µg	0-10	11-13	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40
<i>Deoxyactinomyces</i> ¹												
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Deoxyactin ¹	30 µg	12-13	14-15	16-17	18-19	20-21	22-23	24-25	26-27	28-29	30-31	32-33
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Polymyxin B ¹	200 µg	10-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60	61-65
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Polymyxin E ¹	120 µg	6-7	8-10	11-13	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Streptomycin ¹	6 µg	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40	41-43	44-46
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Trimethoprim ¹	10 µg	12-14	15-17	18-20	21-23	24-26	27-29	30-32	33-35	36-38	39-41	42-44
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Vancomycin ¹	30 µg	10-14	15-17	18-20	21-23	24-26	27-29	30-32	33-35	36-38	39-41	42-44
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
Vancomycin ¹	6 µg	10-14	15-17	18-20	21-23	24-26	27-29	30-32	33-35	36-38	39-41	42-44
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												
<i>Haemophilus spp.</i> ¹												
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}												

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Russ ^a	Inter ^b	Buscept ^c	col ATCC 25922	aureus ATCC 25923	aeruginosa ATCC 27853	influenzae ATCC 49247	influenzae ATCC 49619	gonorrhoeae ATCC 49226	pneumoniae ATCC 49619
Chloramphenicol	LOM-10	10 µg	—	—	—	27-33	23-29	22-28	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹⁰			≥ 16	19-21	≥ 22	—	—	—	33-41 ^c	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ¹⁰			≥ 28	27-37	≥ 38	—	—	—	—	—	48-64 ^d	—
<i>N. gonorrhoeae</i> disc			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	LOP-30	30 µg	—	—	—	23-29	23-31	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>M. luteus</i> and staphylococci ¹			≤ 14	15-17	≥ 18	—	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ¹⁰			≤ 15	16-18	≥ 19	—	—	—	—	—	—	—
Neomycin	NEM-10	10 µg	—	—	—	26-34	28-37 ^d	27-33	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹			≤ 13	14-15	≥ 16	—	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ¹⁰			—	—	≥ 20	—	—	—	70-28 ^c	—	—	—
Methicillin	MZ-75	75 µg	—	—	—	23-29	—	10-25	—	—	—	—
Enterobacteriaceae and Acinetobacter ¹			≤ 17	18-20	≥ 21	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>			≤ 15	—	≥ 10	—	—	—	—	—	—	—
Minocycline	MI-30	30 µg	—	—	—	18-25	28-30	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci and enterococci ¹⁰			≤ 14	15-18	≥ 19	—	—	—	—	—	—	—
Moxalactam	MOX-30	30 µg	—	—	—	28-35	18-24	17-25	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹			≤ 14	15-22	≥ 23	—	—	—	—	—	—	—
Nalidixic Acid	NA-30	30 µg	—	—	—	—	—	16-22	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> (non- <i>S. aureus</i>) ¹⁰			≤ 10	13-12	≥ 13	—	—	—	—	—	—	—
Nalidixic Acid	NA-30	30 µg	—	—	—	22-28	—	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae ¹⁰			≤ 13	14-18	≥ 19	—	—	—	—	—	—	—
Neomycin	N-30	30 µg	—	—	—	17-25	18-25	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹			≤ 16	17-18	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Netilmicin	NET-30	30 µg	—	—	—	22-30	22-31	17-23	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹			≤ 12	13-14	≥ 15	—	—	—	—	—	—	—
Nitrofurantoin	FN-300	300 µg	—	—	—	20-25	18-22	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, staphylococci and enterococci ¹			≤ 14	15-16	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Norfloxacin	NOR-10	10 µg	—	—	—	28-35	17-28	22-20	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci ¹⁰ and enterococci ¹			≤ 12	13-16	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Novobiocin	NB-30	30 µg	—	—	—	—	22-31	—	—	—	—	—
(Usester Hinton agar with sheep blood for veterinary use)			≤ 14	15-18	≥ 17	—	—	—	—	—	—	—
Ofloxacin	OFX-5	5 µg	—	—	—	29-33	24-28	17-21	—	—	—	—
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci ¹⁰			≤ 12	13-15	≥ 16	—	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ¹⁰			—	—	≥ 16	—	—	—	31-40 ^c	—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i> disc			≤ 24	25-30 ¹⁰	≥ 31	—	—	—	—	—	43-61 ^d	—
<i>S. pneumoniae</i> (all and other staphylococci non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic) ¹⁰			≤ 12	13-15	≥ 16	—	—	—	—	—	—	16-21 ^e
Oxacillin	OX-1	1 µg	—	—	—	—	18-24	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> (non- <i>S. aureus</i>) ¹⁰			≤ 10	11-12	≥ 13	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococci, coagulase-negative (non- <i>S. pneumoniae</i>) ¹⁰			≤ 17	—	≥ 18	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. pneumoniae</i> (for penicillin (1 susceptibilty) 9h)			—	—	≥ 20	—	—	—	—	—	—	8-12 ^e
Oxalic Acid	OA-2	2 µg	≤ 10	—	≥ 11	20-24	19-13	—	—	—	—	—
Penicillin	P-10	10 U	—	—	—	—	26-37	—	—	—	—	—
Staphylococcus spp. (10)			≤ 28	—	≥ 29	—	—	—	—	—	—	—
Enterococcus spp. (10)			≤ 14	—	≥ 16	—	—	—	—	—	—	—

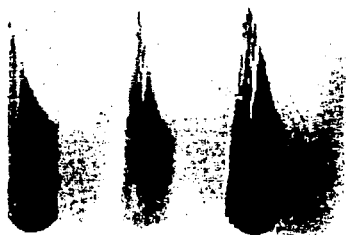
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Antibiótico Agent Code Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter (mm)								
	Resistant	Intermediate	Susceptible	Coli ATCC 2622	Staph aureus ATCC 2922	Staph aureus ATCC 27853	Influenza ATCC 4624	Influenza ATCC 4978	Staph aureus ATCC 4922	Pneumoniae ATCC 4961		
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>N. gonorrhoeae</i> d, g, g	≤ 19	20 - 27	≥ 28								26 - 34 ^d	24 - 30 ^e
Streptococci (non-S. pneumoniae) e, i, j, k	≤ 19	20 - 27	≥ 28									
Piperacillin PIP-100 100 µg	≤ 17	18 - 20	≥ 21	24 - 30	—	25 - 33						
Enterobacteriaceae and Acinetobacter <i>P. aeruginosa</i>	≤ 17	—	≥ 18									
Piperacillin/Tazobactam TAZ-110 100/10 µg	≤ 17	18 - 20	≥ 21	24 - 30 ^d	27 - 36	25 - 30 ^h						
Enterobacteriaceae and Acinetobacter <i>Staphylococcus</i> spp. i, j and <i>P. aeruginosa</i> k	≤ 17	—	≥ 18									
Polymyxin B f, dd	≤ 8	9 - 11	≥ 12	12 - 10	—	—						
Rifampin RA-5 5 µg	≤ 16	17 - 19	≥ 20	6 - 10	12 - 26	26 - 34						
<i>Staphylococcus</i> spp. e, h and <i>Enterococcus</i> spp. j, k	≤ 10	17 - 19	≥ 20				22 - 30 ^e	—				25 - 30 ^e
<i>Haemophilus</i> spp. c	≤ 16	17 - 18	≥ 19									
<i>S. pneumoniae</i> g, s, s	≤ 15	16 - 18	≥ 19	30 - 36	27 - 33	21 - 20 ^g						
Spartofloxacin SPX-5 5 µg	≤ 16	18 - 18	≥ 19									
<i>Staphylococcus</i> spp. e, h	≤ 15	16 - 18	≥ 19									
<i>S. pneumoniae</i> g, s, s	≤ 16	18 - 18	≥ 19									21 - 27 ^e
Spectinomycin SPT-100 100 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18								23 - 20 ^d	
<i>N. gonorrhoeae</i> d	≤ 14	15 - 17	≥ 18									
Streptomycin S-300 300 µg	6	7 - 9	≥ 10	—	—	—						
Testing enterococci for high level resistance n, o, p, q	≤ 11	12 - 14	≥ 15	12 - 20	14 - 22	—						
Enterobacteriaceae S-10 10 µg	≤ 11	12 - 14	≥ 15									
Sulfisoxazole II S-25 250 µg	≤ 12	13 - 15	≥ 17	15 - 23	24 - 34	—						
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci and <i>V. cholerae</i> m	≤ 12	13 - 15	≥ 17									
Tetracycline e, s 1e-30 30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19	18 - 25	24 - 30	—						
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci, enterococci j, k and <i>V. cholerae</i> m	≤ 14	15 - 18	≥ 19									
<i>N. gonorrhoeae</i> d, u, v	≤ 30	31 - 37	≥ 38								30 - 42 ^d	27 - 31 ^e
<i>S. pneumoniae</i> g and other streptococci c	≤ 18	19 - 22	≥ 23	24 - 30	—	22 - 29						
Ticarcillin TIC-75 75 µg	≤ 14	15 - 19	≥ 20									
Enterobacteriaceae and Acinetobacter <i>P. aeruginosa</i>	≤ 14	—	≥ 15									
Ticarcillin/Clavulanic Acid TCA-75 75/10 µg	≤ 14	15 - 19	≥ 20	25 - 29	29 - 37	20 - 28						
Enterobacteriaceae and Acinetobacter <i>P. aeruginosa</i>	≤ 14	—	≥ 15									
Staphylococcus spp. f	≤ 22	—	≥ 23									
Tobramycin NN-10 10 µg	≤ 19	13 - 14	≥ 15	18 - 26	18 - 29	19 - 25						
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci	≤ 19	—	≥ 20									
Trimethoprim TMP-S 5 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16	21 - 26	10 - 26	—						
Enterobacteriaceae and staphylococci	≤ 10	—	≥ 11									
Trimethoprim Sulfamethoxazole II SXT 23.75 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16	24 - 32	24 - 32	—						
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci and <i>V. cholerae</i> m	≤ 10	—	≥ 11									
<i>Haemophilus</i> spp. d	≤ 10	11 - 15	≥ 16				24 - 32 ^e	—				
<i>S. pneumoniae</i> g	≤ 15	16 - 18	≥ 19									20 - 28 ^e
Trovafloxacin TVA-10 10 µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	20 - 30	20 - 35	21 - 27						
<i>Haemophilus</i> spp. c	—	—	≥ 22				32 - 39 ^e	—				
<i>N. gonorrhoeae</i> d	—	—	≥ 34 ^h								42 - 56 ^d	
<i>S. pneumoniae</i> g and other streptococci c	≤ 15	16 - 18	≥ 19									25 - 32 ^e
Vancomycin VA-30 30 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19									
<i>Staphylococcus</i> spp. e, h	≤ 15	16 - 18	≥ 19									

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ANEXO No. 15**RESULTADOS POSITIVOS DE ALGUNAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Se ilustran 3 picos de flauta de agar TSI. El tubo del centro muestra una conversión amarilla de la profundidad que indica una producción de ácidos a partir de glucosa, en comparación con la no reactividad del tubo control a la izquierda. El ennegrecimiento del tubo a la derecha indica producción de H₂S.



Caldo Rojo de fenol que muestra la conversión a amarillo del tubo a la derecha por fermentación de glucosa, en comparación con el control negativo no inoculado a la izquierda.

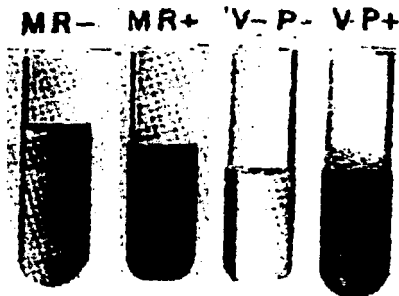
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Medio con nitratos que muestra una reacción positiva luego del agregado de α -naftilamina y ác. Sulfanílico. El m.o., en estudio ha reducido los nitratos en el medio a nitritos, que reaccionaron con los reactivos formando el pigmento rojo p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina



Caldos que ilustran las pruebas de rojo de metilo (MR) y Voges Proskauer (VP). La aparición de color rojo en el tubo con rojo de metilo indica una caída del pH a 4.5 o menos, el color rojo en el tubo VP indica la presencia de acetil-metil carbinol., formado a partir de la vía metabólica del etilenglicol.



Se ilustra medio O/F. Obsérvese que el medio en el tubo a la derecha de cada par está cubierto por una capa de aceite mineral (cerrado). El par de tubos a la izquierda muestran una conversión ácida amarilla del medio, lo que indica un fermentador de glucosa. Sólo la porción superior del tubo abierto del par a la derecha muestra un color amarillo, lo que indica un m.o., oxidativo.



Tiras de papel para prueba de citocromooxidasa que muestra una reacción positiva color púrpura (arriba, en comparación con el control negativo (abajo). Un m.o., que da una reacción positiva puede excluirse de la familia de las Enterobacterias.



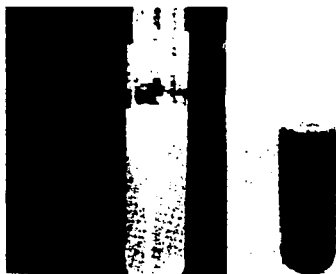
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medio SIM (tubo 1) . Medio KIA (Tubo 2). Aquí se muestran las diferencias de sensibilidad para detectar H_2S por parte de diferentes medios. El difuso ennegrecimiento delicado en el tubo SIM es producido por un m.o., móvil y débil productor de H_2S . Obsérvese que no se detecta H_2S en el tubo con KIA menos sensible.



1 2

Tubos de SIM que ilustran un m.o., inmóvil (tubo 1) y un m.o., móvil y productor de H_2S (tubo 2)

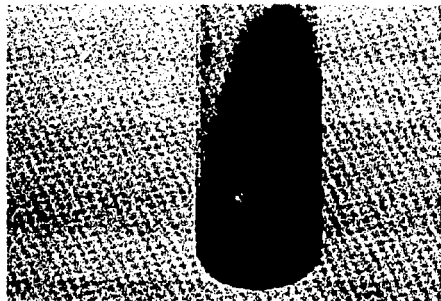


1 2

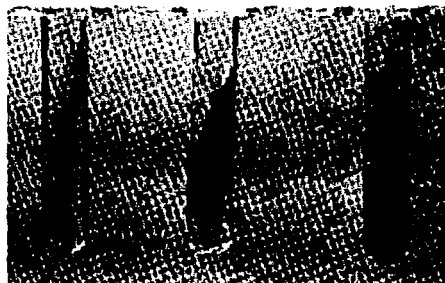
Medio Möeller cubierto con una capa de aceite mineral para proporcionar un medio ambiente anaerobio. El indicador púrpura de bromocresol es amarillo con un pH ácido y púrpura con un pH alcalino. Cualquier tubo que se vea de color púrpura es indicativo de m.o., que pueden descarboxilar el aminoácido (LOA) en el medio.



Tubo de Agar citrato de Simmons que ilustra la presencia de crecimiento en el pico de flauta y una conversión de indicador azul de bromotimol a un color azul alcalino, ambas observaciones indican que el microorganismo puede utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono.



Tres picos de flauta de agar urea de Christensen. El tubo a la derecha muestra una prueba positiva fuerte (color rojo en todo el medio que indica una reacción alcalina por degradación de urea), en comparación con el tubo control negativo a la izquierda (color amarillo). La reacción en el tubo central es producida por m.o., como especies de *Klebsiella*.

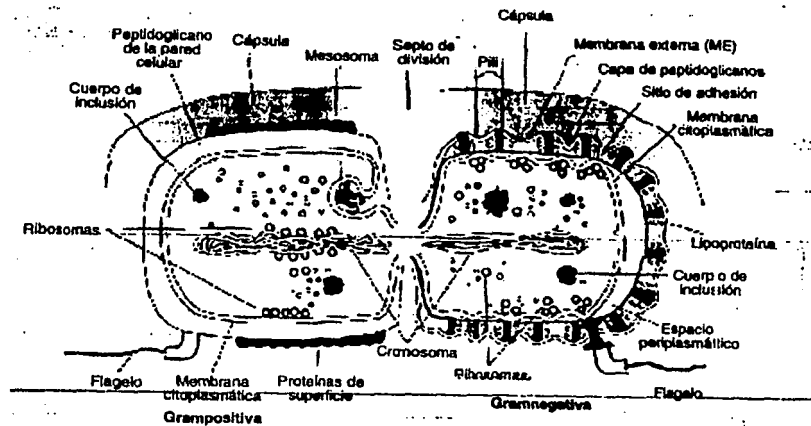


Tubos con medio SIM que ilustran el característico color rojo fucsia debajo de la capa de cloroformo, indicando una reacción de indol positiva (izquierda) en comparación con un control negativo derecha).



ANEXO No. 16

ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR BACTERIANA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**