

GUÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO EN BACTERIOLOGÍA CLÍNICA

CÁTEDRA DE BACTERIOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones (UNaM)
E-mail: bacterio@fceqyn.unam.edu.ar

DOCENTES DE LA CÁTEDRA

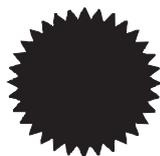
Profesora Titular
Marta Vergara

Profesora Adjunta
Marina Quiroga

Jefes de Trabajos Prácticos:

Patricia Oviedo
Eduardo Pegels
Margarita Laczeski

AÑO 2009



EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

San Luis 1870
Posadas - Misiones
Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:
edunam-admini@arnet.com.ar
edunam-direccion@arnet.com.ar
edunam-produccion@arnet.com.ar
edunam-ventas@arnet.com.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra

Coordinación de la edición: Claudio O. Zalazar

Armado de interiores: Francisco A. Sánchez

Corrección: Amelia E. Morgenstern

Vergara, Marta

Guía para el diagnóstico en bacteriología clínica. - 1a ed.
- Posadas : EDUNAM - Editorial Universitaria de la
Universidad Nacional de Misiones, 2009.

148 p. ; 30x21 cm.

ISBN 978-950-579-124-8

1. Bacteriología Clínica.

CDD 616.014

Fecha de catalogación: 09/03/2009

ISBN: 978-950-579-124-8

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Universidad Nacional de Misiones

Posadas, 2009

ÍNDICE

GUÍA N° 1

Las Infecciones del Tracto Urinario 5

GUÍA N° 2

Las Infecciones del Tracto Genital17

GUÍA N° 3

Las Infecciones del Tracto Respiratorio39

GUÍA N° 4

Las Infecciones de Piel - Partes

Blandas y Hueso63

GUÍA N° 5

Las Infecciones del Sistema Nervioso

Central (SNC)-meningitis75

GUÍA N° 6

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA).....89

GUÍA N° 7

Zoonosis: Brucelosis- Leptospirosis 105

ANEXO 1

Abordaje para iniciar el estudio de la

tipificación bacteriana: Esquemas, tablas

y pruebas de identificación mínimas 117

ANEXO 2

Detalle de algunas de las técnicas, pruebas

bioquímicas y medios de cultivo,

mencionados en el texto 133

GUÍA N° 1

Las Infecciones del Tracto Urinario

El laboratorio debe proveer detalladas instrucciones a fin de asegurar una correcta recolección de la muestra.

INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

● LA DIETA

La dieta previa a la toma de la muestra tiene por finalidad disminuir el riesgo de tener resultados falsos negativos, ya que tanto el uso de antimicrobianos o quimioterápicos, la modificación del pH urinario o la dilución de la orina pueden provocarlos.

Las recomendaciones sugeridas al respecto son:

1. No tomar antibióticos ni quimioterápicos 48 horas antes (salvo pedido especial del médico para un control intra-tratamiento).
2. No tomar aspirinas ni vitamina C 24 horas antes.
3. No tomar jugos cítricos, ni comerlos (pomelo, naranja, limón, etcétera) 12 horas antes.
4. No ingerir líquidos en exceso.

● LA HIGIENE

A diferencia de la dieta, la higiene previa a la toma de muestra se realiza con la finalidad de disminuir los resultados falsos positivos por contaminación con flora de la piel, perineo, próstata, uretra o vagina.

Estas recomendaciones difieren según el sexo del paciente.

Recomendaciones para el Sexo Femenino:

- Lavado exhaustivo de los genitales externos con agua y jabón neutro, de adelante hacia atrás.
- Secar con toalla limpia.
- Colocación de un tapón vaginal (torunda de gasa o algodón).
- Se recomienda orinar apartando los labios durante la micción.

Recomendaciones para el sexo masculino:

- Lavado con agua y jabón neutro de la zona balanoprepucial y glande con prepucio retraído. En los circuncidados, se lava también sobre el glande y la zona peri-meato.
- Secar con toalla limpia.

Para ambos sexos se debe recomendar que no utilicen antisépticos, ya que pueden afectar el resultado, provocando un descenso en el recuento de colonias.

• LOS TIPOS DE MUESTRA Y SU RECOLECCIÓN

En niños y adultos que controlan esfínteres se recomienda trabajar con muestra obtenida por micción espontánea con la técnica del chorro medio.

Preferentemente se debe obtener la primera orina de la mañana, lo que permite un adecuado recuento de bacterias evitando dar valor a una posible contaminación, indicando al paciente que vacíe su vejiga antes de acostarse.

De no ser posible una retención prolongada o cuando la clínica lo impone, recoger la orina con un tiempo de retención mínimo de tres horas.

Orina obtenida por chorro medio

Luego de la higiene previa, al iniciar la micción se debe descartar la primera porción de la orina (primeras gotas), recolectar la segunda porción en un frasco estéril con tapa a rosca y desechar la última porción (últimas gotas).

El volumen recomendado a recolectar es de 25 a 50 ml y no menos de 3 ml.

En niños y adultos que no controlan esfínteres se puede utilizar diferentes métodos de recolección.

Orina obtenida por micción al acecho

En el caso de los bebés, se debe indicar al acompañante del niño que debe concurrir al laboratorio provisto de una mamadera con el líquido que acostumbra a ingerir.

La hora de concurrencia al laboratorio dependerá del ritmo miccional del niño.

Se retiran los pañales y se lava la zona anal y perianal con agua y jabón, de inmediato enjuagar con agua hervida y enfriada.

En la niña el lavado se efectuará de adelante hacia atrás ubicándola en posición “ginecológica”. Luego se la coloca en posición inclinada, parcialmente sentada mientras se mantienen los miembros inferiores en abducción, de tal manera que el chorro miccional no se deslice por la cara interna de los muslos.

Es conveniente que después de efectuada la higiene, se administre alguna clase de líquido para facilitar la diuresis.

Se prepara el recipiente estéril (con la tapa semicerrada) para poder ser abierto sin mayores dificultades en el momento que el bebé comienza a orinar.

Se descarta el primer chorro y recolecta la segunda porción de la muestra.

Conviene cambiar el frasco cada 30 minutos, si se lo mantiene abierto.

Se debe solicitar dos muestras en un plazo no mayor de 24 horas, para evitar falsos diagnósticos, dada la frecuencia de hallazgos discordantes entre el sedimento y cultivo en el estudio bacteriológico de la infección urinaria del lactante.

No se debe aceptar el uso de bolsitas colectoras para los lactantes, dado que se obtiene un elevado número de falsos positivos (contaminaciones) por la vecindad con la zona anal.

Orina obtenida por cateterismo

Esta forma de recolección se considera una alternativa a la punción vesical pero es también un procedimiento invasor y puede generar arrastre retrógrado de microorganismos.

Esta técnica debe ser cuidadosa, aséptica y efectuada por personal capacitado.

Para efectuarla se desinfecta la zona perianal, se introduce la sonda por la uretra y se recoge, en un recipiente estéril, la porción media de la orina.

De igual modo puede obtenerse muestras a partir de ureterostomías, nefrostomías o vesicostomías.

En estos casos:

- Dejar fluir la orina retenida en la boca del conducto;
- Limpiar la boca del conducto con un hisopo humedecido en alcohol;
- Introducir un catéter en el conducto;
- Permitir el drenaje de la orina; y
- Recoger la parte media del chorro en recipiente estéril.

Este último método de recolección es de elección en pacientes con cateterismo intermitente.

Orina obtenida por punción de sonda

En el paciente sondado, la muestra debe ser tomada preferentemente por punción suprapúbica (PSP).

De no ser posible, la técnica recomendada por tener el menor índice de falsos positivos (hasta un 10%), es la punción de la sonda (PSV).

Es importante tener en cuenta que jamás se debe recolectar orina del extremo de una sonda que no ha sido recién colocada ni remitir para el análisis la punta de la sonda vesical, ya que generalmente las sondas vesicales están colonizadas a las 48 horas de instaladas y los microorganismos aislados no necesariamente son los causantes de la infección urinaria.

En este método de recolección:

- Desinfectar previamente la superficie de la zona de la sonda donde se realizará la punción (aproximadamente a unos 10 cm del meato) con povidona-yodo o clorhexidina.
- Deja secar.
- Volver a limpiar la zona con solución fisiológica estéril.
- Luego de la higiene de la zona, pinzar la sonda con aguja y jeringa estéril.
- Aspirar la orina (punción-aspiración).

Si bien antes era indicado, actualmente se recomienda no pinzar la sonda para la toma de muestra.

Cuando la sonda se retira por algún motivo (tiempo de permanencia, infección, etcétera) y se coloca una nueva, es conveniente efectuar el estudio inmediatamente de colocada la misma.

En este único caso, la muestra puede obtenerse por el drenaje de la sonda cuidando de que no toque los bordes del recipiente. Luego se procede de manera similar a la metodología descrita.

La ventaja de este método es que no presenta riesgos para el paciente.

Su rendimiento es comparable, en un 90%, con la punción vesical.

Orina obtenida por punción suprapúbica (PSP)

Este método de confirmación diagnóstica está indicado en cualquier tipo de pacientes, en especial neonatos y lactantes graves cuando:

- hay dudas en el diagnóstico o resultados contradictorios en distintas tomas de muestras previas por micción espontánea, cuyos urocultivos arrojen datos conflictivos;
- se sospecha infección por microorganismos exigentes, bacterias anaerobias o por *Candida* spp.;
- es también útil para confirmar el diagnóstico de infección urinaria por microorganismos habitualmente contaminantes de piel y mucosas.

Las ventajas de este método incluyen que:

- se obtiene directamente orina vesical,
- permite sembrar la orina en medio líquido y así poner de manifiesto gérmenes que se encuentran en baja concentración,
- solo puede contaminarse con gérmenes de piel (menos del 0,1%) o de intestino por atravesar un asa,
- es la única metodología válida para la investigación de bacterias anaerobias en la orina.

A pesar de sus ventajas, esta técnica está contraindicada en:

- pacientes con infecciones de piel en la zona perineal o abdominal, y
- pacientes con tumores.

• EL TRANSPORTE Y LA CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Toda muestra debe llevar los datos filiatorios del paciente y estar acompañada de un formulario y/o recetario médico donde se indique:

- nombre, edad y sexo del paciente;
- si es mujer, indicar la presencia de embarazo;
- existencia de patología de la vía urinaria;
- método empleado en la recolección de la muestra;
- diagnóstico clínico;
- uso previo de antibióticos;
- hora de obtención de la muestra.

Las muestras deben conservarse en heladera entre 4°C y 8°C (nunca en congelador), desde que se obtienen, hasta que se procesan.

Si la orina debe transportarse a distancia, puede disponerse de un recipiente de material aislante en el que se colocará el frasco, manteniéndolo refrigerado.

Solo para la PSP la refrigeración, aunque conveniente, no es absolutamente necesaria como en los casos anteriormente descritos.

Si no es factible el procesamiento inmediato, las muestras pueden mantenerse refrigeradas (4°C–8°C) durante 24 horas sin que se altere el recuento bacteriano.

En caso de tener evidencias de ausencia de refrigeración de la orina, o cuando el tiempo o método de recolección no ha sido cumplido según las indicaciones del laboratorio, se debe solicitar nueva muestra.

● PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Determinación de caracteres fisicoquímicos

Todo examen bacteriológico debe incluir examen macroscópico (olor, color, aspecto), pH, densidad y proteínas.

Valores altos de pH se encuentran a menudo en infecciones por gérmenes que desdoblan la urea, como *Proteus*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Klebsiella* spp. que también alcalinizan la orina.

Es importante la determinación del pH porque puede influir en la elección del agente antimicrobiano, ya que la actividad de ciertos antibióticos está influida por el pH.

Tener en cuenta que tanto un pH bajo (< 5) como un pH elevado (> 8) dificultan la reproducción bacteriana.

Otro dato de importancia es la densidad de la orina.

Valores inferiores a 1003 podrían dar resultados falsos negativos debido a la escasez de nutrientes para el desarrollo microbiano.

Estudio del sedimento

1. Homogeneizar la orina con agitación suave.
2. Centrifugar aproximadamente 10 ml en tubo cónico a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, o a 2500 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Volcar el sobrenadante.
4. Observar microscópicamente el sedimento entre porta y cubreobjeto con aumento de 400X.

En este estudio, observar la presencia o no de leucocitos, eritrocitos y/o cilindros. También se puede realizar una estimación de la presencia o no gérmenes. La presencia de células descamativas y/o mucus en una paciente mujer, sugiere que la muestra está contaminada con secreción vaginal.

Coloración de Gram de Orina Total

Esta observación se efectúa en una gota de orina sin sedimentar.

Una bacteriuria de 10^5 UFC/ml puede predecirse con un 90% de probabilidad, al observar en un frotis coloreado por Gram, de orina bien mezclada sin centrifugar, 2 (dos) o más bacterias por campo microscópico 1000X.

Está también indicada en: pacientes que están recibiendo antibióticos, pacientes que presentan sedimento patológico con cultivos negativos (para verificar la presencia de microorganismos exigentes) y pacientes con sepsis de punto de partida urinario.

La presencia de numerosas células epiteliales escamosas y diferentes morfotipos microbianos indica frecuentemente contaminación, por lo que se debería solicitar una nueva muestra.

Siembra de la muestra

La siembra debe realizarse a partir de la orina sin centrifugar con el método elegido para la realización del recuento bacteriano (ansa calibrada o dilución).

Para los bacilos gramnegativos se aconseja usar un medio lactosado con indicador de pH y que inhiba el crecimiento invasor de algunos *Proteus* spp.

El medio de cultivo más utilizado es el agar CLDE (cistina–lactosa deficiente en electrolitos) ya que, además de poseer las condiciones antes descritas, permite el desarrollo de bacilos gramnegativos, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

En caso de utilizar otros medios lactosados como el agar EMB Levine (Eosina Azul de Metileno conteniendo solo lactosa), que inhibe el desarrollo de los cocos grampositivos, siempre se debe sembrar en forma paralela una placa conteniendo un medio de cultivo no inhibidor, como agar nutritivo, agar tripticasa soya o agar Mueller Hinton, entre otros.

Recuento de colonias

El recuento de colonias tiene por finalidad calcular el número de colonias existentes por mililitro de orina.

El dato que se obtiene no es determinante, pues debe correlacionarse con las manifestaciones clínicas del paciente, el diagnóstico presuntivo, el tipo de microorganismo aislado, la presencia o no de respuesta inflamatoria, la concentración de la orina, el tratamiento antimicrobiano y/o medicamentoso que recibe el paciente y la técnica de recolección, entre otros factores a considerar.

Existen varios métodos para realizarlo y la elección de uno u otro depende de la disponibilidad del laboratorio y del entrenamiento del operador.

A. Método de la dilución en tubos

Para realizar este método, considerado “clásico” y de mayor precisión, se diluye la orina (1/10–1/100, etcétera) en solución fisiológica estéril, se siembra una alícuota (0,1 ml) en el medio de cultivo a utilizar y se disemina con espátula de Drygalski.

Luego de la incubación, se cuentan las colonias y se multiplica por la dilución efectuada a fin de obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml.

B. Método del ansa calibrada

Luego de homogenizar la muestra se levanta una porción con un ansa calibrada y se la disemina en el medio de cultivo a utilizar.

Tener en cuenta el calibre del ansa dado por el fabricante para calcular el factor de dilución.

En general la carga del ansa es de 5 microlitros, por lo que cada colonia que aparece en la placa corresponde a 200 UFC/ml, factor por el que hay que multiplicar el número de colonias contadas a fin de obtener el número de UFC por ml presente en la muestra.

Es conveniente utilizar el ansa calibrada solo para la siembra de urocultivos y recordar que aproximadamente cada 300 orinas sembradas, el ansa debería cambiarse a fin de mantener el calibre de la misma.

Los recuentos bacterianos una vez calculados según el número de colonias obtenidas por ml de orina se deben informar en forma de rangos (menor a 10^3 , entre 10^3 – 10^4 , mayor a 10^5 , etcétera) y no con números exactos (por ejemplo, 23400 UFC/ml).

Luego de procesadas, se recomienda guardar las muestras de orina refrigeradas hasta obtener el resultado del cultivo.

Incubación de las placas

La atmósfera de incubación utilizada es la aerobiosis, excepto si se incluyen placas de agar sangre o chocolate, las que se recomienda incubarlas en ambiente con 5–7% de CO_2 (puede usarse al método de lata con vela si no se dispone de estufa de cultivo con CO_2).

La temperatura de incubación (excepto en casos que se sospeche alguna micosis) debe realizarse a 35°C.

El tiempo de incubación recomendado es de 72 horas, antes de descartar las placas como “negativas”.

Interpretación de los cultivos

La interpretación del cultivo debe realizarse conjuntamente con la valoración de los datos del paciente (clínica, edad, sexo, enfermedad de base), característica de la muestra (sedimento, pH, densidad), recuento de colonias, características y número de cepas aisladas, a fin de asociar el o los aislados con un proceso infeccioso.

Para interpretar los resultados tener en cuenta la frecuencia de las infecciones poli-microbianas, que se producen habitualmente en enfermos sometidos a cateterismos o a ciertos tipos de tratamientos invasivos.

No olvidar que las infecciones monomicrobianas representan más del 95% y dentro de estas, las causadas por enterobacterias ocupan un lugar de privilegio.

Recordar que:

El término bacteriuria significativa implica: 10^2 a $\geq 10^4$ UFC/ml + síntomas urinarios y piuria.

El término bacteriuria asintomática implica:

-Dos cultivos positivos con recuento de colonias superior o igual a 10^5 UFC/ml del mismo microorganismo, sin síntomas clínicos de infección urinaria y sin respuesta inflamatoria o sedimento normal.

-En embarazadas, independientemente del sedimento urinario, una sola muestra de chorro medio con un recuento de colonias superior o igual a 10^5 UFC/ml y desarrollo de una sola cepa, debe ser estudiada por el riesgo que implica para la paciente (pielonefritis) y/o para el desarrollo normal del embarazo (parto pretérmino o bajo peso del niño al nacer).

A. Cultivos monomicrobianos

En pacientes adultos de cualquier sexo, un recuento mayor o igual a 10^3 UFC/ml con respuesta inflamatoria positiva implica una bacteriuria significativa.

En ausencia de respuesta inflamatoria, solo un recuento mayor o igual a 10^5 podría significar una bacteriuria significativa probable.

En pacientes sondados un cultivo con un recuento mayor a 10^2 UFC/ml, independientemente de la respuesta inflamatoria, debería ser estudiado.

En niños, en especial en aquellos que aún no controlan esfínteres, es conveniente solicitar siempre dos muestras, las que se deben evaluar simultáneamente.

La interpretación de los recuentos en cultivos de orina de pacientes pediátricos varían según el sexo de los mismos y la forma de recolección de la muestra.

Para las niñas, en muestras obtenidas por la técnica del chorro medio, se considera que un recuento mayor o igual a 10^5 UFC/ml podría significar una bacteriuria significativa probable si se interpreta el recuento de una sola muestra, y una bacteriuria significativa verdadera si se lo interpreta en dos muestras.

Los recuentos entre 10^4 – 10^5 UFC/ml obligan a solicitar nuevas muestras, mientras que los recuentos inferiores a 10^4 UFC/ml no son significativos.

Para los niños, en muestras obtenidas por la técnica del chorro medio, se considera que un recuento mayor o igual a 10^4 UFC/ml implica una bacteriuria significativa verdadera cualquiera sea el número de muestras interpretadas.

Los recuentos entre 10^3 – 10^4 UFC/ml obligan a solicitar nuevas muestras.

Los recuentos inferiores a 10^3 UFC/ml no son significativos.

Estos valores se modifican si la muestra fue obtenida por sondaje.

Tanto para las niñas como para los niños, en muestras obtenidas por sondaje, un recuento mayor o igual a 10^5 UFC/ml implica una bacteriuria significativa verdadera y un recuento de 10^4 – 10^5 UFC/ml una probable bacteriuria significativa, debiendo solicitarse nuevas muestras en caso de recuentos de entre 10^3 – 10^4 UFC/ml.

Los recuentos inferiores a 10^3 UFC/ml no son significativos.

En neonatos, la mejor muestra (gold standard) es la PSP.

Si la muestra del neonato fue obtenida por PSP, el desarrollo de bacilos gramnegativos o levaduras es significativo cualquiera sea el recuento.

Si se trata de cocos grampositivos, se considera significativo un recuento mayor a 10^3 UFC/ml.

Si la muestra fue obtenida por sondaje uretral, un recuento mayor a 10^4 UFC/ml implica una bacteriuria significativa.

Los recuentos entre 10^3 – 10^4 UFC/ml obligan a solicitar nueva muestra. Recuentos inferiores a 10^3 no son significativos.

B. Cultivo polimicrobiano

Al hablar de cultivo polimicrobiano de orina se hace referencia a la presencia de 2 o más gérmenes, en recuentos mayores de 10^5 UFC/ml y en proporciones similares.

El predominio de un solo germen en una muestra en proporción del 90% debe asumirse como monomicrobiano. La infección mixta es extremadamente infrecuente (<0,3%) en pacientes ambulatorios no sondados. Recordar que una infección mixta infiere la presencia de un factor urológico predisponente.

La ITU polimicrobiana significativa podría ser asumida como tal, si se documenta la presencia de 2 o más gérmenes en igual proporción, en 2 tomas de orina correctamente recolectadas y donde se observe sedimento patológico.

Identificación de los aislamientos

Las colonias desarrolladas deberán ser estudiadas por pruebas bioquímicas basadas en la investigación de productos del metabolismo del germen que actúan sobre diferentes sustratos.

De disponerse se realizará la tipificación serológica.

Susceptibilidad de los aislamientos a antimicrobianos

Ante un cultivo significativo y la conveniencia de continuar con el estudio bacteriológico deberá efectuarse la determinación de la sensibilidad de la cepa aislada, no olvidando que en casos excepcionales de ITU mixtas, deberá identificarse y estudiarse la sensibilidad de cada cepa por separado.

Para tal fin, resulta suficiente en la mayoría de los casos, el ensayo de difusión en agar con discos de antimicrobianos (método de Kirby–Bauer).

El laboratorista debe recordar que lo importante es ensayar e informar los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias, los que son apropiados para las distintas especies y según las características del paciente.

- los antimicrobianos deberán presentar eliminación activa por orina,
- ser activos a pH habitual de orina (5,5–7,0),
- alcanzar significativa concentración en el parénquima renal,
- presentar baja nefrotoxicidad y escasas reacciones secundarias.

La selección de los antimicrobianos debería hacerse:

-Según las características de cada paciente (por lo que es fundamental la comunicación con el médico tratante), ya que por ejemplo en embarazadas no se debería incluir la sensibilidad a quinolonas, cotrimoxazol (TMS) o nitrofurantoina (según el trimestre del embarazo).

En niños (excepto en situaciones excepcionales) no se deberían informar quinolonas.

Informe de los resultados de los cultivos

El informe del laboratorio debería ser adecuado y oportuno en tiempo y forma a fin de que colabore con el diagnóstico y no produzca confusiones.

El informe de urocultivo debe contener: forma en que se ha obtenido la muestra (chorro medio, sonda, PSP, etcétera), pH y densidad de la orina, resultados de la observación microscópica del sedimento (células epiteliales planas, células redondas, hematíes, cilindros y leucocitos) en forma cuantitativa (cantidad por campo microscópico de 400X) y de manera optativa el Gram de Orina Total (GOT) (informar cualitativamente).

Además se debe informar si se obtuvo o no desarrollo microbiano.

En caso positivo el recuento de colonias obtenido, la identificación del o de los gérmenes recuperados y la sensibilidad antibiótica del o de los mismos.

• INFORME

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos. El informe propuesto para el urocultivo se muestra en la página siguiente.

CONSIDERACIONES GENERALES

Lo que **NO debe hacerse** al realizar un UROCULTIVO:

1. Omitir la refrigeración de la orina (4°C–8°C) hasta el momento de la siembra.
2. Dejar de efectuar el urocultivo a un paciente que tiene más de tres horas de retención.
3. No hacer la determinación de pH, densidad y sedimento de la muestra.
4. Sembrar en caldos orinas de micción espontánea.
5. Efectuar el recuento de colonias sembrando el sedimento de la orina.
6. Descartar las placas del recuento de colonias sin haber cumplido las 72 horas de incubación.
7. Pretender identificar el agente etiológico basándose únicamente en el aspecto de las colonias.
8. Efectuar un antibiograma sin aislamiento previo.
9. Informar recuento de colonias con cifras exactas que superan la precisión o finalidad del método.
10. Informar recuento de colonias sin que se acompañe de la identificación del germen.
11. Informar antibiograma sin identificación del germen.
12. Realizar e informar antibiograma de *Proteus* spp. recuperado de orinas de pH ácido.

El urocultivo es imprescindible para el diagnóstico.

En la interpretación del urocultivo suele ser indispensable descartar los resultados falsos positivos y falsos negativos para lograr un diagnóstico acertado.

UROCULTIVO

Muestra obtenida por:

- chorro medio
- sonda
- punción suprapúbica
- cateterismo vesical
- nefrostomía

pH.....

densidad.....

Exámen en fresco

- Sedimento (400 X)
 - células epiteliales planas:.....por campo
 - células redondas:..... por campo
 - hematíes:..... por campo
 - cilindros:..... por campo
- Leucocitos
 - a)..... por campo (400 X)
 - b)...../mm³ (Cámara de Neubauer - optativo)
- Gram (informar cualitativamente) Optativo

CULTIVO

Negativo

Recuento de colonias

- Opciones
- a) Negativo
 - b) No se obtuvo desarrollo
 - c) <10² ufc/mL (Optativo)

Positivo

Recuento de colonias:.....UFC/ml.

Identificación: 1).....

2).....

Pruebas de sensibilidad

- Observaciones:**
- Muestra con probable contaminación
 - Se solicita nueva muestra para confirmar el diagnóstico
 - Otras

Resultados falsos positivos: (Recuentos significativos sin que exista IU)

1. Por contaminación de bacterias que no están presentes en la orina vesical y que pueden provenir de uretra en casos de uretritis, vagina en caso de mala higiene o incorrecta colocación del tapón vaginal, zona vulvovaginal en las niñas (la vulvovaginitis en las niñas es muy frecuente y se caracteriza por presentar flora mixta), prepucio en los niños con fimosis o individuos de prepucio largo que no eliminan adecuadamente la primera parte de la micción o heces en los lactantes.
2. Por tratarse de orinas remitidas o conservadas fuera de la cadena de frío (4°C –8°C).
3. Por punción de asas intestinales al realizar la PSP.
4. Por contaminación en el laboratorio.

Resultados falsos negativos: (Recuentos bajos o sin desarrollo existiendo IU)

1. Densidad de la orina muy baja (menor a 1003) ya que no se aportan los nutrientes suficientes para la reproducción bacteriana a un ritmo normal.
2. pH de las orinas ubicados en los extremos (pH inferior a 5 o superior a 8) no permitiendo la reproducción normal de algunos gérmenes.
3. Tiempo de retención de orina insuficiente (menor de tres horas que no permite alcanzar una cifra alta de recuento bacteriano).
4. Presencia de focos renales que no drenen a los tubos o bien obstrucciones uretrales completas.
5. Infecciones por bacterias que no desarrollan en los medios usados habitualmente como *Mycoplasma spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, anaerobios, *C. urealyticum*, etcétera.
6. Infecciones producidas por variantes bacterianas.
7. Tratamiento antibiótico reciente.
8. Uso de desinfectantes locales.

CONCLUSIONES

Es importante considerar que no se puede hacer un diagnóstico correcto de una infección urinaria que permita implementar una terapéutica eficaz sin tener en cuenta al menos tres aspectos fundamentales:

- una correcta recolección,
- transporte y conservación de la orina,
- la identificación y el conocimiento del agente etiológico y,
- un informe adecuado y oportuno.

Además debemos recordar que, en especial en niños, solicitar nueva muestra implica la reiteración de una maniobra a veces dificultosa, un nuevo viaje al laboratorio u hospital con el correspondiente costo económico, el ausentismo del niño y/o de los padres o el retraso en una cirugía o cistouretrografía con el consiguiente riesgo de cicatrices renales si era una infección urinaria verdadera.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison–Kenneth Todar University of Wisconsin–Madison 2002–2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330homepage>.
- Bantar, C.; Lopardo, H. Urocultivo. Procesamiento, criterios de interpretación e informe. Apuntes de Laboratorio 1. Laboratorios Britania. 1997.
- Dalet, F.; del Río, G. Infecciones Urinarias. Fundación PUIGVERT. ENE Publicidad, S.A. 1996.
- Gobernado, M.; López–Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin* 21(Supl. 2): 54–60. 2003.
- Isenberg, H. D. (Ed). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM press, Whashington D.C. 1998.
- Nicolle, L. E.; Bradley, S.; Colgan, R.; Rice, J. C.; Schaeffer, A.; Hooton T. M. Infectious Diseases Society of America Guidelines for the diagnosis treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Inf Dis* 29: 745–758. 1999.
- Sociedad Argentina de Infectología (SADI), Sociedad Argentina de Urología (SAU), Sociedad Argentina de Medicina (SAM), Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Buenos Aires (SOGIBA). Consenso Argentino Intersociedades para el Manejo de la Infección del Tracto Urinario. Parte I. *Rev Panam Infectol* 9(3):57–69. 2007.
- Soloaga, R.; Procopio, A.; Fernández, A.; Squassi, V.; Tokumoto, M. Utilidad de los cultivos cuantitativos en bacteriología clínica. *Infect. & Microbiol. Clin.* 11(2):12–32. 1999.

GUÍA N° 2

Las Infecciones del Tracto Genital

INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE INFECCIONES VAGINALES

- No colocarse tabletas vaginales.
- No hacerse lavajes internos (bidet u otra ducha vaginal con agua de abajo hacia arriba), 12 horas antes.
- No tener relaciones sexuales 48 hs. antes. (por el efecto sobre la ecología microbiana que podría producir el **líquido seminal**, que presenta un pH elevado y una alta concentración de zinc y fructosa).

DATOS DE LA PACIENTE

Edad de la paciente: (neonatal, primera y segunda infancia, menarca, años reproductivos, embarazo, menopausia).

Uso de antimicrobianos: la acción sobre la flora.

Uso de tampones, toallas higiénicas durante el ciclo menstrual o protectores diarios: el sobrecrecimiento de *Staphylococcus aureus* y bacterias de la flora fecal como *Escherichia coli*, entre otros.

Cirugías ginecológicas previas: la alteración de la flora vaginal.

Ciclo menstrual: la flora habitual y el pH.

Embarazo: el aumento del glucógeno celular.

En el puerperio, período crucial para la instalación de infecciones del tracto genital superior, la presencia de sangre y loquios favorecen la presencia de anaerobios y enterobacterias, disminuyendo los lactobacilos.

Relaciones Sexuales: se produce un aumento transitorio del pH vaginal, siendo importantes para la transmisión de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* u otros microorganismos.

-El tipo de relación sexual (vaginal, anal, oral).

-Algunos autores refieren que el número de relaciones sexuales por semana y el número de parejas sexuales (3 o más a lo largo de la vida) aumenta el riesgo de adquirir vaginosis bacteriana.

Métodos anticonceptivos: el dispositivo intra-uterino (DIU) puede aumentar la reacción inflamatoria en el endocervix y el pH vaginal.

-Uno de los microorganismos implicados en las infecciones de las mujeres que usan DIU ha sido *Actinomyces israelii*, el que puede ser parte de la flora normal pero la presencia de DIU favorecería la colonización e infección del endometrio.

-Las jaleas espermicidas, por el cambio de pH, provocan modificaciones en la ecología vaginal, mientras que los anticonceptivos orales favorecen el desarrollo de una microbiota vaginal semejante a la observada durante el embarazo.

TOMA DE MUESTRA

● EN INFECCIONES VAGINALES

En niñas

Se recoge la secreción vulvovaginal.

En mujer adulta

Se debe recoger la muestra con la ayuda de un espéculo, evitando el uso de lubricantes ya que la mayoría de ellos resultan bacteriostáticos, con buena luz y la paciente ubicada en posición ginecológica.

Utilizar dos hisopos diferentes:

-1º Hisopo: recoger las secreciones del fondo de saco vaginal, colocar en un tubo estéril y rotular correctamente. (Se utilizará para investigar la presencia de Trichomonas, levaduras, vaginosis bacteriana, determinación del pH y del test de aminas).

-2º Hisopo: limpiar el cuello de útero (endocervix) para que quede libre de secreciones y mucus vaginales.

Insertar el hisopo algunos milímetros dentro del canal cervical y obtener el exudado, colocarlo en un tubo estéril (distinto al anterior) y rotular correctamente. (Se utilizará para investigar la presencia de gonococos, micoplasmas, etcétera).

De haberse solicitado el estudio de *Chlamydia*, utilizar un tercer hisopo, adecuado para tal fin (de dracón, alginato de calcio o poliéster) ya que el algodón atenta contra la recuperación y viabilidad de los microorganismos y el soporte de madera desprende productos tóxicos al ponerse en contacto con el medio de transporte.

Insertar el hisopo en el canal cervical y rotar a fin de obtener células cervicales.

Tener en cuenta que los microorganismos que pueden producir patología se localizan en diferentes sitios: algunos de ellos lo hacen en el epitelio estratificado (para ello se utiliza el hisopo obtenido de fondo de saco vaginal), mientras que otros solo pueden establecerse en el epitelio columnar del endocervix o en la zona límite entre ambos (para ello se utiliza el hisopo obtenido de cuello de útero).

Microorganismos que se localizan en el epitelio estratificado (saco vaginal): *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis*, complejo GMM (*Gardnerella vaginalis*, anaerobios, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma* spp.), *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, entre otros.

Microorganismos que se localizan en el epitelio columnar (endocervix): *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Listeria monocytogenes*.

En otras infecciones del tracto genital femenino

-Para estudio de infecciones en glándula de Bartolino, endometrio, fondo de saco de Douglas; trompas de Falopio y líquido amniótico, se deberá solicitar muestra obtenida por Punción-Aspiración (PAS).

-Para el estudio del dispositivo intrauterino, se solicitará el envío del dispositivo completo obtenido por extracción quirúrgica.

-Para el estudio de lesiones genitales compatibles con sífilis (chancro) se tomará muestra del exudado de la lesión.

Limpiar la superficie con solución salina y eliminar la costra si la hubiere. Raspar la lesión hasta que fluya líquido seroso. Limpiar. Tratar de evitar el sangrado. Presionar la base de la lesión hasta que fluya un líquido claro. Tocar suavemente el líquido con un portaobjeto y cubrir con un cubreobjeto. Examinar inmediatamente al microscopio de campo oscuro.

-Para el estudio de *Clostridium perfringens*, una buena técnica es recoger el exudado con hisopo estéril de cavidad cervical, sin contacto con el aire.

Este microorganismo, que puede estar presente como flora normal vaginal, se encuentra únicamente como patógeno en útero y como sus toxinas lisan los glóbulos blancos, el exudado que se produce es más serosanguinolento que purulento.

Como la muestra está generalmente contaminada con flora vaginal, la observación de un frotis coloreado debe ser realizada con mucho detenimiento.

Se consignará su hallazgo solo si está como flora predominante, informándose si existe correspondencia clínico-bacteriológica, no debiendo esperar el resultado del cultivo para iniciar un tratamiento adecuado. El mismo debe realizarse apenas se produce la sospecha.

En el caso de infección uterina, los elementos a tener en cuenta son la radiografía que mostrará la presencia de gas y el comienzo de hemólisis en sangre periférica.

-Para el estudio de tuberculosis (TBC) genital, si la infección tiene localización uterina, se investiga el germen a partir de la sangre menstrual tomando con pipeta o hisopo estéril la muestra del lecho sanguíneo. Se recoge sangre menstrual de los dos primeros días de la menstruación durante tres meses consecutivos. Otra muestra que se puede analizar para tal fin es el raspado de endometrio.

• TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Si la muestra fue extraída en el laboratorio, la siembra en los medios de cultivo apropiados debe ser realizada de inmediato. De no ser posible, se puede conservar una hora como máximo, colocando el hisopo o el material tomado con ansa en 0,5 ml de agua estéril. No colocar en frío.

En caso de existir demora en llegar al laboratorio, cada uno de los hisopos se colocarán en medio de transporte (se aconsejan el de Stuart o el de Amies).

El medio de transporte se deberá mantener a temperatura ambiente, y las muestras se deberán procesar en un lapso no mayor a 12 hs a fin de preservar la viabilidad de microorganismos susceptibles a las condiciones adversas, como los gonococos.

Para el estudio de micoplasmas, las muestras (obtenidas con hisopo o las muestras líquidas) se deben procesar de inmediato o colocarse en un medio de transporte adecuado (puede ser Stuart reducido o el provisto por el fabricante si se usan equipos comerciales de diagnóstico), el que puede conservarse a temperatura ambiente (18° a 25°C) durante 8 horas, o a 2° a 8°C durante 16 horas.

Para el estudio de clamidias, las muestras pueden almacenarse secas a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas.

Si se requiere un almacenamiento más prolongado, pueden conservarse hasta 5 días a temperatura de 2° a 8°C.

NO congelar los hisopos después de recoger la muestra, excepto si el diagnóstico se realizará por cultivo celular (en ese caso se conservarían las muestras a -70°C).

Las muestras obtenidas por punción-aspiración (PAS) se conservan a temperatura ambiente (en la jeringa con aguja obturada con tapón de goma o caucho) y deben ser procesadas lo más rápidamente posible.

● PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Es prioritario establecer por microscopía el estado del contenido vaginal, junto al cultivo, en mujeres sintomáticas, estén o no embarazadas.

Además, estos datos deben ser incorporados e informados en todo control de embarazada asintomática, a fin de aportar al conocimiento de potenciales alteraciones del balance de la microbiota actual como así también de la respuesta inflamatoria.

● EXAMEN GENERAL DE LA MUESTRA

Un flujo de pH elevado no abundante, color grisáceo, olor fuerte, nos hace presumir la presencia de flora anaeróbica o *Trichomonas vaginalis* o vaginosis bacteriana por complejo GAM.

Un flujo de características acuosas, blanquecino, abundante, espumoso, nos hace presumir la presencia de *Trichomonas vaginalis*.

Un flujo blanquecino, de consistencia caseosa (semejante al queso) nos hace presumir la presencia de hongos (por ej. *Candida albicans*).

● DETERMINACIÓN DEL pH DE LA MUESTRA

El pH se debe tomar en el momento de la toma de muestra, al lado del paciente, con cintas de pH con un rango que permita diferenciar entre el pH habitual según paciente o modificado (por ejemplo mujer fértil pH habitual <4,5).

● EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

Es muy importante realizarlo con detenimiento (en 400X).

Del hisopo obtenido de fondo de saco posterior, los datos que SIEMPRE hay que valorar son:

- Presencia o no de *Trichomonas vaginalis*, ya que aportamos un elemento diagnóstico.
- Presencia o no de elementos levaduriformes y pseudomicelios, compatibles con *Candida* spp.
- Presencia o no de células claves, también denominadas células guías o “clue cells”, que es uno de los elementos diagnósticos de vaginosis bacteriana por complejo GAM (*Gardnerella-Anaerobios-Mobiluncus*).
- Respuesta inflamatoria positiva (10 o >10 leucocitos PMN por campo 400X) o negativa (< de 10 PMN/campo 400X).
- Test de aminas (con OHK al 10%).

Insistimos en la necesidad de realizar este examen en fresco en la mayor brevedad posible puesto que la desecación o el cambio de temperatura puede afectar la movilidad de *Trichomonas vaginalis* y dificultar así, su observación.

Del hisopo obtenido de endocérvix, SIEMPRE valorar:

-Respuesta inflamatoria positiva (10 o >10 leucocitos PMN por campo 400X) o negativa (< de 10 PMN/campo 400X).

● **EXAMEN MICROSCÓPICO PREVIA COLORACIÓN DE GRAM**

La coloración de Gram se realiza, tanto del hisopo obtenido de fondo de saco posterior como de endocérvix.

Se deberá valorar:

- Presencia o ausencia de flora lactobacilar
- Presencia o ausencia de flora compatible con complejo GAM
- De observarse un desplazamiento de flora (por ejemplo solo bacilos gramnegativos) deberá informarse.

El hecho de observar diplococos gramnegativos extra o intracelulares, **no** nos permite hacer un diagnóstico de infección gonocócica puesto que un pequeño porcentaje de mujeres presentan gérmenes con estas características que no son *Neisseria gonorrhoeae* y que se encuentran como parte de su flora normal.

Recordar que la investigación bacteriológica de vía genital en la mujer debe realizarse siempre por cultivo.

DISFUNCIÓN VAGINAL PRIMARIA: LA VAGINOSIS BACTERIANA (VB)

La **Vaginosis Bacteriana (VB)**, constituye una de las disfunciones vaginales primarias.

Los síntomas que pueden presentarse en la vaginosis bacteriana son: flujo genital (a veces ausente), prurito y ardor vulvar, disuria, dispareunia, entre otros.

Entre los signos se destacan: descarga vaginal grisácea, homogénea, con mal olor, distribuida sobre toda la pared vaginal (signo de la pincelada), eritema vulvar, menstruaciones ligeramente fétidas, mal olor postcoital.

Para el diagnóstico de vaginosis bacteriana (VB), no es necesaria la siembra de la muestra ya que, si bien el cultivo vaginal tiene una alta sensibilidad, su valor predictivo positivo es menor al 50%.

Los criterios diagnósticos más aceptados son:

A) CRITERIOS DE AMSEL Y COLABORADORES

Es diagnóstico de vaginosis bacteriana a complejo GAM, cuando se cumplen **por lo menos tres** de los cuatro elementos siguientes:

1. **secreción homogénea (ausencia o escasos leucocitos):** ésta infección cursa con ausencia o un número reducido de PMN (menos de 10 por campo 400X).
2. **pH vaginal mayor a 4,5:** Tener en cuenta que el pH también puede estar elevado (falsos positivos) ante la presencia de: semen, moco cervical, sangre menstrual, ducha vaginal.
3. **olor a pescado al agregar OHK al 10% (Test de aminas):** La prueba tiene como objeto comprobar que la elevación del pH es debida a la producción de aminas (putrescina, cadaverina y trimetilamina) procedentes del metabolismo anaeróbico.

Se realiza colocando una parte del exudado vaginal sobre un portaobjeto y dejando caer sobre ella una gota de una solución de HOK al 10%. El olor a “pescado” se siente por la volatilización de las aminas aromáticas a pH francamente alcalino.

4. **presencia de células claves o “clue cells”**: el examen directo nos muestra la presencia de abundantes células epiteliales de bordes indefinidos con gran cantidad de bacilos adosados a sus paredes (células claves, células guías o “clue cells”) y ausencia o escasos leucocitos.

Tener en cuenta que células claves existen, o se observan también cuando se trata de infecciones a *Trichomonas vaginalis* o vaginosis a predominio de flora anaeróbica.

Tanto el pH como el test de aminas son pruebas **muy sensibles** para el diagnóstico de VB (más del 95% de sensibilidad) pero **poco específicas** ya que una buena parte de las tricomoniasis vaginales el flujo tiene pH > 4.5 y el test de aminas es positivo.

La coloración de Gram nos permitirá observar, la ausencia de *Lactobacillus* spp. y la presencia de células vaginales muy alteradas (a menudo con pérdida de los límites citoplasmáticos y halo claro perinuclear y fundamentalmente, bordes celulares alterados) con masas de cocobacilos gramnegativos pleomórficos supracelulares (*Gardnerella*- Anaerobios) y pequeños bacilos curvos (*Mobiluncus*).

Existen VB en las que las células claves no se observan o no son típicas.

En el examen en fresco es importante no confundirlas con células epiteliales recubiertas de lactobacilos firmemente adheridos a las células vaginales.

B) CRITERIOS DE NUGENT Y COLABORADORES

En este sistema se asigna un valor pre-determinado “score” (del 1 al 10) a los diferentes morfotipos bacterianos observados en una coloración del Gram del exudado vaginal.

La observación se realiza con objetivo de inmersión (1000X) teniendo en cuenta la morfología (morfotipo) y cantidad de bacterias por campo.

| Score | <i>Lactobacillus</i> (morfotipos) | <i>Gardnerella</i> y <i>Bacteroides</i> spp. (morfotipos) | Bacilos curvos Gram variable |
|-------|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| 0 | > 30 | 0 | 0 |
| 1 | 5-30 | <1 | 1-4 |
| 2 | 1-4 | 1-4 | 5- >30 |
| 3 | <1 | 5-30 | - |
| 4 | 0 | >30 | - |

El criterio se obtiene de la suma de los “score” obtenidos (morfotipos de *Lactobacillus* + morfotipos de *Gardnerella* y *Bacteroides* spp. + bacilos curvos Gram variable):

- 7 (siete) o mayor a 7: vaginosis bacteriana,
- 4 (cuatro) a 6 (seis): intermedio,
- 0 (cero) a 3 (tres); normal.

En el marco de la atención de laboratorio, ha sido propuesto utilizar el Estudio del Balance del Contenido Vaginal (BACOVA) para cubrir el requerimiento clínico de detección primaria de disfunción vaginal.

El BACOVA otorga un valor numérico al balance de la microbiota habitual vaginal, utilizando los criterios de Nugent:

- 0 a 3: equilibrio normal de la microbiota vaginal,

- 4 a 6: microbiota con cambios intermedios,
- 7 a 10: desequilibrio de la microbiota.

Esta última valoración, asociada a la ausencia de respuesta inflamatoria, es diagnóstico de VB.

El BACOVA también informa sobre la respuesta inflamatoria vaginal (con valores numéricos), la presencia de *Trichomonas*, levaduras, morfotipos bacterianos extraños y células epiteliales anormales.

La utilización del sistema BACOVA ha demostrado los valores predictivos, tanto positivos como negativos, más altos para el diagnóstico de VB.

CERVICITIS

Para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*, sembrar la muestra obtenida de endocervix (uretral, anal o faríngea) en medios selectivos con factores de crecimiento e inhibidores de la flora habitual) tipo Thayer-Martin.

No obstante esto, el simple agar chocolate es un medio que permite la recuperación de *N. gonorrhoeae*, obteniéndose además en este medio el desarrollo de flora acompañante.

Recordar que en el sexo femenino puede existir como flora habitual *Veillonella* spp., **diplococo gramnegativo, morfológicamente similar a *N. gonorrhoeae***. Por lo que en especial en niñas, si se toma solo en cuenta la observación microscópica para estudiar una secreción, se podría cometer un grave error con consecuencias de variado impacto, incluso legales.

Recordar que a diferencia de lo que ocurre en el sexo masculino, **el examen directo y por coloraciones** en materiales ginecológicos, sobre todo cervical, **no posee una sensibilidad adecuada**, lo que no permite utilizar estas técnicas como métodos de tamizaje y es por ello, imprescindible efectuar el cultivo para un correcto diagnóstico.

La observación en fresco nos permite ver generalmente una reacción inflamatoria positiva.

Neisseria gonorrhoeae es un germen sumamente exigente y en Thayer-Martin (T-M), cuenta con un elemento que es indispensable para su crecimiento como es el complejo vitamínico B (por la adición de Iso-Vitalex), además del agregado de una mezcla antibiótica (vancomicina, colistin, trimetoprima y nistatina) que inhibe la flora acompañante.

Recomendamos siempre sembrar una placa de agar chocolate junto al T-M, ya que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* pueden ser sensibles a la vancomicina.

Debido a que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sumamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas, las cepas deben ser incubadas a 35°C a 36°C en una atmósfera húmeda, enriquecida con CO₂ (puede usarse el método de la vela) por 24 a 48 horas. Descartar recién a las 72 horas.

Se deben subcultivar las colonias que parecen gonococos de un medio de cultivo primario selectivo (como el Thayer-Martin) a un medio de cultivo no selectivo, como agar chocolate a fin de obtener un cultivo puro de aislamiento.

Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de una cepa aislada de un **medio selectivo** por la morfología de las colonias, la observación de diplococos típicos (gramnegativos) en parejas, tétradas o racimos por coloración de Gram y reacción oxidasa positiva.

Un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislado de un **medio de cultivo no selectivo** puede basarse en las características descriptas más una reacción apropiada en por lo menos una prueba suplementaria, bioquímica o enzimática.

• **CONDICIONES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE *Neisseria gonorrhoeae***

- Temperaturas extremas de frío y calor:** requieren incubación entre 35°C y 36,5°C.
- Atmósfera inadecuada:** requieren atmósfera enriquecida con CO₂ (3% a 5% CO₂) para el aislamiento primario. Debe usarse una incubadora de CO₂ o un recipiente con la vela en extinción. Encender la vela cada vez que el frasco se abra para añadir placas. No usar velas perfumadas (sus vapores pueden ser tóxicos para las bacterias).
- Ausencia de humedad:** es extremadamente sensible al secado, y debe ser incubada en una atmósfera húmeda. Colocar una bandeja plana con agua en el fondo de la incubadora, una toalla de papel o un pedazo de algodón humedecido en el frasco de vela. Reemplazar la toalla de papel o el algodón humedecido diariamente para evitar el crecimiento de mohos que puedan contaminar los cultivos. El frasco de vela debe descontaminarse periódicamente.
- Medio de crecimiento inadecuado:** son microorganismos exigentes, que requieren suplementos para el crecimiento.
- Tiempo de incubación prolongado:** normalmente sobreviven 48 horas de cultivo. Los aislamientos deben ser subcultivados cada 18 a 24 horas.
- Materiales de hisopo:** algunos algodones no tratados pueden ser tóxicos para *N. gonorrhoeae*, como puede ser el aplicador de madera si está en contacto con las bacterias por un período largo. Sin embargo, no usar solo hisopos hechos de materiales sintéticos ya que a menudo estos no absorben fácilmente el líquido. Por otro lado, los hisopos sintéticos tienen aplicadores plásticos flexibles que cuando se aprietan contra la pared de un tubo o placa para extender el líquido, pueden rociar la suspensión, lo cual puede causar infecciones adquiridas en el laboratorio.

Si un aislamiento presuntivo presenta características inusuales a las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos se debe confirmar la identificación con pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Actualmente, se puede investigar *N. gonorrhoeae* en forma directa a partir de muestras clínicas mediante el test de enzimoimmunoensayo (ELISA), que en el sexo femenino tiene una sensibilidad de aproximadamente del 90%, permitiendo detectar antígenos gonocócicos, sin el requerimiento de la viabilidad bacteriana.

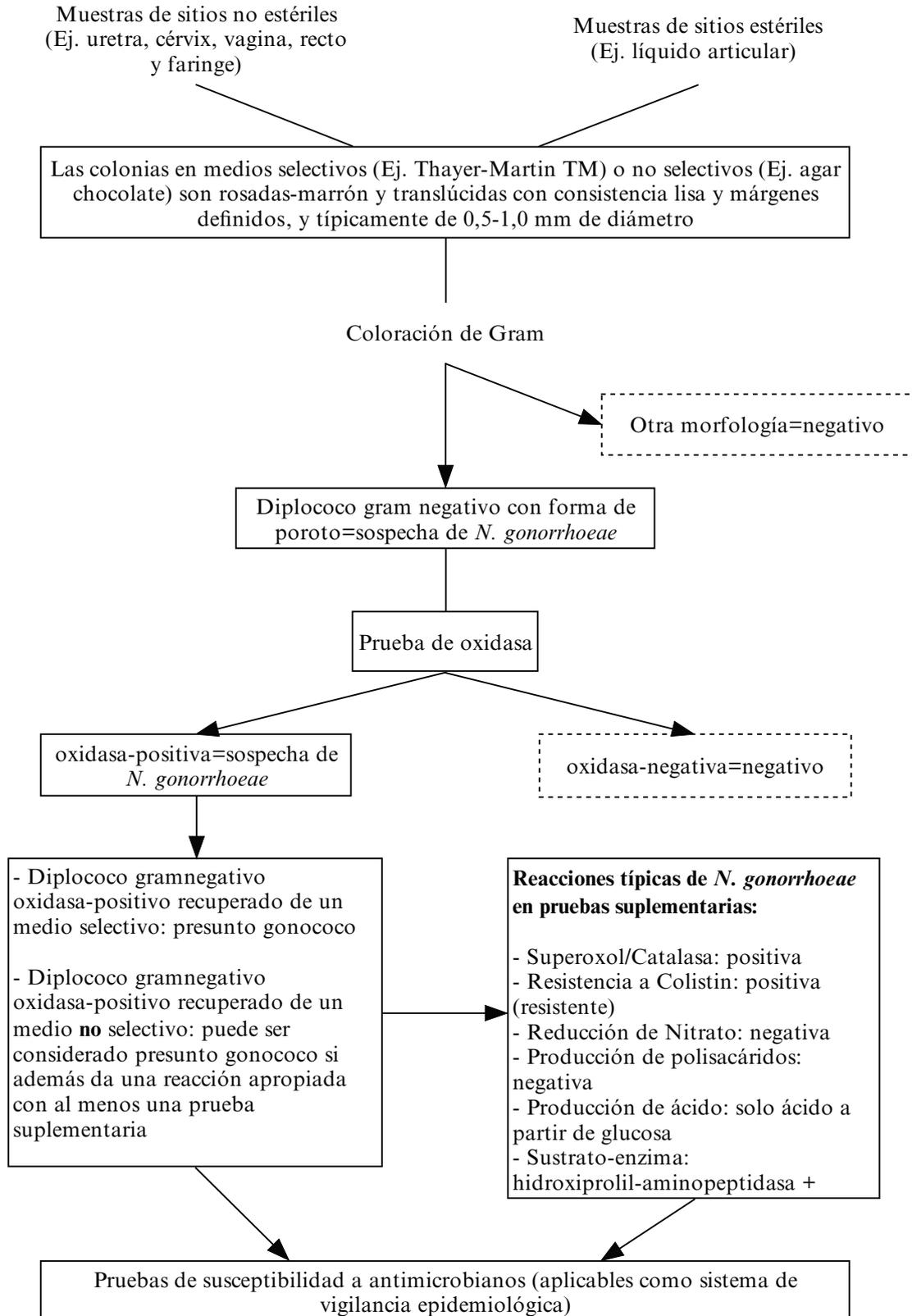
Recordar que en caso de *N. gonorrhoeae*, la serología carece de valor.

Sí tiene eficacia el uso de la inmunofluorescencia como método de diagnóstico, ya sea usando el material clínico o bien la cepa obtenida de cultivo fresco. Esta técnica está recomendada en la búsqueda de *N. gonorrhoeae* con fines epidemiológicos o examen pasivo, por su rapidez aunque tiene menor sensibilidad.

Para el diagnóstico de micoplasmas, la muestra a tomar debe ser de acuerdo a la patología que se sospeche.

| Sospecha clínica | Muestra |
|---------------------------------------|---|
| Uretritis no gonocócica (UNG) | Secreción uretral y/o 1er.chorro miccional |
| Prostatitis | Secreción prostática |
| Fiebre post-parto y/o aborto | Hemocultivos, endocérvix y/o endometrio |
| Pielonefritis. Síndrome uretral | Orina por punción suprapúbica |
| Infertilidad masculina | 1er chorro y esperma |
| Infertilidad femenina | Endocérvix y/o endometrio. Líquido peritoneal |
| Abortos a repetición | Endocérvix. Fruto del aborto. |
| Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) | Material tomado por aspiración a través de catéter protegido por laparoscopia o culdocentesis |

DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS PRUEBAS PARA AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE CEPAS DE *N. GONORRHOEAE**



Adaptado de Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo- OMS-CDC-2003).

Recordar que los micoplasmas carecen de pared celular, por lo que no se pueden colorear ni observarse al fresco. La coloración de naranja de acridina (observación con microscopio de inmunofluorescencia) solo es útil para detectar micoplasmas en hemocultivos.

El cultivo es **imprescindible** pudiendo utilizarse medios selectivos con urea y arginina (U9) y medios sólidos diferenciales (Medio A7 de Shepard) donde se aprovechan sus propiedades metabólicas, diferentes tiempos de desarrollo, pH óptimo y atmósfera de incubación como el A7.

De utilizarse estos medios, la identificación puede realizarse en forma presuntiva por la morfología de las colonias y la identificación definitiva según su comportamiento al hidrolizar urea, arginina y glucosa.

En el mercado existen equipos comerciales que permiten la numeración (recuento) e identificación de *Ureaplasma urealyticum* (Uu) y de *Mycoplasma hominis* (Mh) a partir de muestras endocervicales, uretrales, urinarias, gástricas y en esperma, permitiendo en algunos sistemas, la detección de la resistencia a ciertos antibióticos.

Las técnicas en medio líquido se basan en la capacidad de Uu y Mh de metabolizar respectivamente la urea y la arginina. El crecimiento de los microorganismos se visualiza por el viraje de un indicador coloreado- el rojo fenol- del amarillo-anaranjado al rojo que traduce la alcalinización del medio debido a la liberación de amoníaco.

Estas técnicas, en muestras vaginales y uretrales, informan una sensibilidad del 98,2% y una especificidad del 100%, al ser evaluadas en relación con el cultivo en agar A7.

Recordar que los micoplasmas pueden estar presentes como flora transitoria de la mujer o ser parte de la flora normal.

Para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, nunca será reiterativo recalcar la importancia que tiene la correcta toma de muestra.

Es esencial remarcar el concepto de que la muestra deberá contener material celular más que fluidos corporales.

Dada la cantidad de patologías atribuibles a este microorganismo (conjuntivitis, uretritis, epididimitis, cervicitis, endometritis, salpingitis, neumonía del recién nacido, etcétera), a continuación se detallan los posibles sitios de recuperación y la manera de obtener el espécimen.

| | |
|---------------------|---|
| Uretra | Hisopado endouretral (introducir el hisopo 3 a 4 cm en el hombre, 1 a 1,5 cm en la mujer raspando las paredes de la uretra) |
| Cerviz | Hisopado endocervical (introducir el hisopo 1 a 1,5 cm haciéndolo rotar en la zona de transición del endocérvix) |
| Ojos | Hisopado |
| Epidídimo | Aspiración |
| Trompas de Falopio | Hisopado o biopsia |
| Tracto respiratorio | Hisopado naso-faríngeo. Aspiración o biopsia |
| Nódulo linfático | Aspiración |
| Oído medio | Aspiración |

El cultivo se realiza sobre células HeLa, McCoy y BHK (técnica excelente pero que requiere de experiencia y un laboratorio de cultivo celular), con una especificidad del 100% y una sensibilidad entre el 70 a 85%.

El éxito del cultivo depende de la correcta toma de muestra, tipo de hisopo usado, tiempo de transporte al laboratorio y la conservación a -70°C , hasta su procesamiento.

También se puede realizar el diagnóstico a partir de extendidos de materiales clínicos por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales, contra el lipopolisacárido (LPS), o contra la Proteína Mayor de la Membrana Externa (MOMP) (de mayor especificidad).

Actualmente, el enzimoimmunoensayo (ELISA) es una técnica de gran difusión e involucra la extracción de un antígeno lipopolisacárido único en las especies de clamidias.

El ELISA, comercialmente disponible, está preformado para ser usado en muestras uretrales, endocervicales, orina masculina y muestras oftálmicas. En muestras diferentes a las mencionadas disminuye la sensibilidad.

Existen, además, diversas técnicas de biología molecular pero su exquisita sensibilidad obliga a ser cauteloso y muy cuidadoso en la metodología, para evitar resultados falsos positivos por contaminaciones.

El diagnóstico serológico es posible. Las técnicas a utilizar permiten detectar anticuerpos género- específicos (Fijación de complemento, Inmunofluorescencia indirecta, ELISA), anticuerpos especie-específicos (ELISA) o anticuerpos tipo –específicos (Microinmunofluorescencia).

Recordar que en las infecciones oculogenitales por *Chlamydia trachomatis*, no hay correlación entre los hallazgos de títulos de anticuerpos y la detección de antígenos en la muestra clínica por lo que la detección de IgM o IgG no es de utilidad en el diagnóstico de enfermedad actual en el adulto. Además en la población sana hay alta prevalencia de IgG anti-clamidia.

La detección de IgM, sí es útil en el recién nacido.

Recordar que la coloración de lugol solo es recomendada para detectar clamidias en materiales clínicos, como conjuntivitis, **no así en vías genitales** ya que tiene muy baja sensibilidad en muestras genitales femeninas por el glucógeno presente (falsos positivos).

INFORME

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos. El informe propuesto para los exudados genitales (vaginal y endocervical) se muestra en las páginas siguientes.

ÚLCERAS GENITALES

• SÍFILIS

Dado que *Treponema pallidum* no puede recuperarse por cultivo, para el diagnóstico de sífilis se utilizan otras técnicas según sea el período de desarrollo de la enfermedad.

Sífilis primaria

El chancro indoloro, que aparece como la demostración de la penetración del treponema, puede asentar en el glande, surco balano-prepucial, vulva o cérvix, mucosas de la boca, orofaringe, ano y recto.

El diagnóstico es, en esta etapa, por campo oscuro, recomendando al paciente concurrir al laboratorio sin colocarse pomadas, ungüentos, desinfectantes, pues pueden dar resultados falsos negativos.

EXUDADO VAGINAL

pH.....

Test de aminas.....

Exámen directo:

- Células epiteliales: (informe cuantitativo)
- “Clue cells” o células clave
- Leucocitos (por campo de 400X)
- Elementos levaduriformes: se observan (o no se observan). Cuando se observen pseudomicelios se informarán.
- Parásitos: se observa (o no se observa) *Trichomonas vaginalis*.

***Coloración de Gram**

Opciones:

1. Se observa flora con predominio de bacilos gram positivos con morfotipo de lactobacilos y *Corynebacterium* spp.

Interpretación del resultado: Flora normal

2. a. Se observa flora con predominio de bacilos gram positivos con morfología de lactobacilos, cocobacilos gram negativos y bacilos gram negativos con morfología de anaerobio.
 b. Se observa flora con predominio de cocobacilos gram negativos y bacilos gram negativos con morfología de anaerobios. Se observa escasos lactobacilos (<4 / cpo 1000x).

Interpretación del resultado: Flora intermedia o alterada

- c. Se observa flora con predominio de cocobacilos gram negativos y bacilos gram negativos con morfología de anaerobios. No se observa lactobacilos.
 d. Se observa flora con predominio de cocobacilos gram negativos, bacilos gram negativos con morfología de anaerobios y bacilos gram negativos curvos. No se observa lactobacilos.

3. No se observa bacilos gram positivos con morfotipo de lactobacilos (cuando no observen lactobacilos destacar su ausencia dependiendo de la edad de la paciente).

*** Coloración de Giemsa**

se observa (o no se observa) *Trichomonas vaginalis*.

Cultivo

- Micológico: hubo desarrollo (o no hubo) de levaduras.
 - Parasitológico: solo aclarando para aquellos que lo realicen.
- Observaciones: la presencia de puede formar parte de la flora vaginal normal. Deberá ser considerado en el contexto del cuadro clínico de la paciente.

EXUDADO ENDOCERVICAL

Examen Directo

- Recuento de leucocitos por campo 400X
- Coloración de gram: (describir lo que se observa)

Cultivos

Investigación de *Neisseria gonorrhoeae*

- hubo desarrollo de *N. gonorrhoeae* (cuando se la identifica con azúcares)
- hubo desarrollo de diplococos gram negativos compatibles con *N. gonorrhoeae* (cuando solo se hace oxidasa y superoxol)

Pruebas de sensibilidad para *N gonorrhoeae*

Investigación de *Chlamydia trachomatis*

Técnica

- a. Detección de antígeno por técnica de
- b. Cultivo
- c. PCR

Resultado:

Positivo

Negativo

Investigación de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*

Cultivos cuantitativos:

Hubo desarrollo de..... UFC/ml de.....

Observaciones: la presencia de..... puede formar parte de la flora vaginal normal. Deberá ser considerado en el contexto del cuadro clínico de la paciente.

Recordar que en las lesiones bucofaríngeas, no se debe hacer campo oscuro pues *T. microdentium*, de idéntica morfología, puede confundir la observación y dar resultados falsos positivos.

Recordar que la observación debe ser inmediata pues el tiempo y la desecación atentan contra la vitalidad del treponema.

La toma de muestra se realiza limpiando la úlcera con una gasa estéril y solución fisiológica. A continuación, el exudado de la lesión se extiende sobre un portaobjeto evitando la contaminación excesiva con sangre.

Proteger la muestra con un cubreobjeto y observar rápidamente por microscopía de campo oscuro, ya que la desecación reduce la visibilidad de los microorganismos.

Ante la ausencia de treponemas, repetir dos portaobjetos más.

La observación en campo oscuro es la técnica más económica y de diagnóstico de certeza en esta etapa.

Sífilis secundaria

El diagnóstico se realiza por serología utilizando dos tipos de pruebas:

Pruebas no treponémicas: VDRL (cualitativa, cuantitativa).

Pruebas treponémicas: Pruebas de absorción de anticuerpos anti-treponémicos fluorescentes (FTA-ABS), pruebas de hemoaglutinación, como el ensayo de microhemaglutinación *T. pallidum* (MHA-TP).

Interpretación:

VDRL, MHA-TP o FTA-ABS reactivas: diagnostican sífilis actual o pasada.

VDRL reactiva y MHA-TP o FTA-ABS no reactiva: diagnostica otras patologías.

VDRL no reactiva y MHA-TP o FTA-ABS reactiva: diagnostican sífilis tratada o muy reciente.

Recordar que la temperatura para la reacción de VDRL es de 23 a 29°C, temperaturas mayores a 29°C causan VDRL falsa reactiva.

Recordar que se debe evitar el error por el fenómeno de zona en VDRL cuantitativa, a la que se debe recurrir ante toda reacción cualitativa dudosa.

Sífilis tardía

Cobran aquí más importancia las pruebas de MHA-TP o FTA-ABS y el análisis del Líquido cefalorraquídeo por VDRL aún en ausencia de síntomas del Sistema Nervioso Central, teniendo la precaución de diluir la suspensión de antígeno, en partes iguales con solución salina al 10%, y realizarla en placa con pocillos excavados para sensibilizar la reacción.

La VDRL es de utilidad para el seguimiento del paciente.

Sus títulos caen o aumentan abruptamente ante éxito o fracaso (o reinfección) del tratamiento, respectivamente.

Recordar los controles recomendados: VDRL cada 3 meses en las etapas primaria y secundaria hasta 1 año del primer episodio y hasta 2 años en sífilis tardía.

Recordar que los controles se deben realizar en el mismo laboratorio y con la misma marca de reactivos para que los resultados puedan ser comparables.

Sífilis congénita

El recién nacido (RN) sífilítico puede o no presentar síntomas.

Si existen lesiones ampollares y condilomas el diagnóstico se realiza por campo oscuro. Se deben tener en cuenta los siguientes conceptos:

-los anticuerpos IgM no atraviesan la placenta y la serología del RN refleja los anticuerpos maternos (tanto IgG como IgA) que atravesaron placenta y que pueden durar hasta 90 días.

Se debe realizar la prueba IgM-FTA-ABS a fin de diferenciar la transferencia transplacentaria pasiva de anticuerpos maternos al feto o la producción por parte del feto de anticuerpos anti-treponémicos endógenos.

-se debe filtrar el suero para la determinación de IgM, pues puede dar falsos negativos por exceso de IgG materna que bloquea los receptores IgM y falsos positivos por transferencia del factor reumatoideo de la madre.

-la prueba de FTA-ABS puede detectar las inmunoglobulinas de las clases IgG e IgM por lo que no posibilita la diferenciación entre la infección activa y la transferencia pasiva.

-la VDRL es de utilidad si se la compara con la VDRL materna, pues un título del bebé 4 veces mayor o más confirma el diagnóstico, o sea nos dice que el niño ya formó

sus propios anticuerpos, si es igual no permite el diagnóstico. Un aumento de títulos, en controles semanales confirma el diagnóstico.

-las reacciones falso-positivas: exceptuando las causadas por errores técnicos, las demás se denominan también falso-positivas biológicas, las que se presentan, casi todas, con las pruebas no treponémicas y en pacientes que padecen de otras patologías como neumonía, hepatitis, lepra o drogadicción, edad avanzada, entre otras causas.

-se debe realizar una interpretación de resultados, conjuntamente con el médico tratante.

CHANCRO BLANDO

Infección aguda producida por *Haemophilus ducreyi*.

El chancro característico (doloroso, de sangrado fácil, que asienta sobre la piel genital: prepucio, frenillo, horquilla vulvar o labios mayores) una importante puerta de entrada del virus VIH.

Para la toma de muestra se debe eliminar de la lesión toda secreción hasta llegar al lecho de la úlcera y hacerlo sangrar. El material se toma con ansa debajo de los bordes.

Como es característica la formación de bubón, se puede intentar el aislamiento del germen a partir del pus que se obtiene al punzarlo.

El procesamiento debe ser inmediato por la labilidad del microorganismo y por la gran cantidad de flora que puede estar asociada. De ser inevitable, se recomienda el medio de Amies por no más de 24 hs o utilizar como transporte 2-3 ml de sangre de caballo o humana coagulada.

También por la gran cantidad de flora asociada, la coloración de Gram es difícil de interpretar.

Haemophilus ducreyi, se presenta como pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos (pueden ser gram variable) delgados y pleomórficos, con disposición en cadena o en “banco de pescado”.

El diagnóstico se realiza por cultivo.

Al ser un germen exigente es necesario utilizar medios muy enriquecidos. La incubación se debe realizar durante al menos 72 hs a 35°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Los medios base recomendados son el agar GC, agar Columbia o agar Mueller Hinton, a los que se agrega 5% de sangre y se calientan hasta 80°C a fin de obtener agar chocolate, luego se dejan enfriar hasta 40-50°C y se agrega 1% de Isovitalex. Es conveniente agregar al medio (junto al Isovitalex) vancomicina en concentración de 3 mg/L para inhibir el desarrollo de cocos grampositivos.

Las colonias de *Haemophilus ducreyi* son pequeñas, grises, a veces con una pequeña zona de alfa-hemólisis y con la características de deslizarse al tratar de tomarlas con el ansa.

A los fines diagnósticos, siendo *Haemophilus ducreyi* un microorganismo fastidioso y con una forma de presentación clínica típica, se puede realizar un diagnóstico presuntivo con:

- cultivo y desarrollo de las colonias descriptas,
- coloración de Gram,
- y las pruebas de catalasa (negativa para *Haemophilus ducreyi*) y oxidasa (negativa cuando se realiza con el reactivo di-metil-p-fenilendiamina).

LINFOGRANULOMA VENÉREO (LGV)

Esta patología causada por *Chlamydia trachomatis*, serotipos L1, L2, L3, se caracteriza por la formación de un chancro con localización genital o rectal.

El chancro es pequeño, asintomático y en general pasa inadvertido.

El rasgo clínico más destacado es la adenopatía importante que aparece luego del chancro, con la formación de bubón, el que, entre 7-10 días, madura y fistuliza permitiendo la salida de un pus espeso.

La mejor muestra es la obtenida de la punción aspiración del ganglio, preferiblemente antes de que se forme la fístula a fin de evitar la sobreinfección.

El diagnóstico se efectúa por las técnicas habituales de diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, ya descriptas.

También pueden utilizarse técnicas serológicas:

Reacción de fijación de complemento: es de utilidad de existir seroconversión o un título alto (>1/16). Puede haber reacción cruzada con *Chlamydia psittaci*.

Microinmunofluorescencia: es un método más sensible y específico para medir anticuerpos anti-LGV, los títulos altos confirman el diagnóstico.

En la práctica el diagnóstico de LGV se basa en:

- la clínica,
- una fijación de complemento con título de 1/64 en una sola muestra de suero.

STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Streptococcus agalactiae o *Streptococcus* β-hemolítico del grupo “B” (SGB) es el principal agente etiológico de la sepsis neonatal precoz y causa importante de infecciones durante el embarazo y el puerperio.

En la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales se desarrolla el Proyecto PICTO 36831 (Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica Orientados): Estudio de Infecciones Bacterianas Perinatológicas en la Provincia de Misiones, en el marco del Convenio ANCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) y la UNaM (Universidad Nacional de Misiones) que tiene como objetivo estudiar esta problemática.

Las muestras: en gestantes a término, 35-37 semanas de edad gestacional: hisopados introito vaginal y rectal.

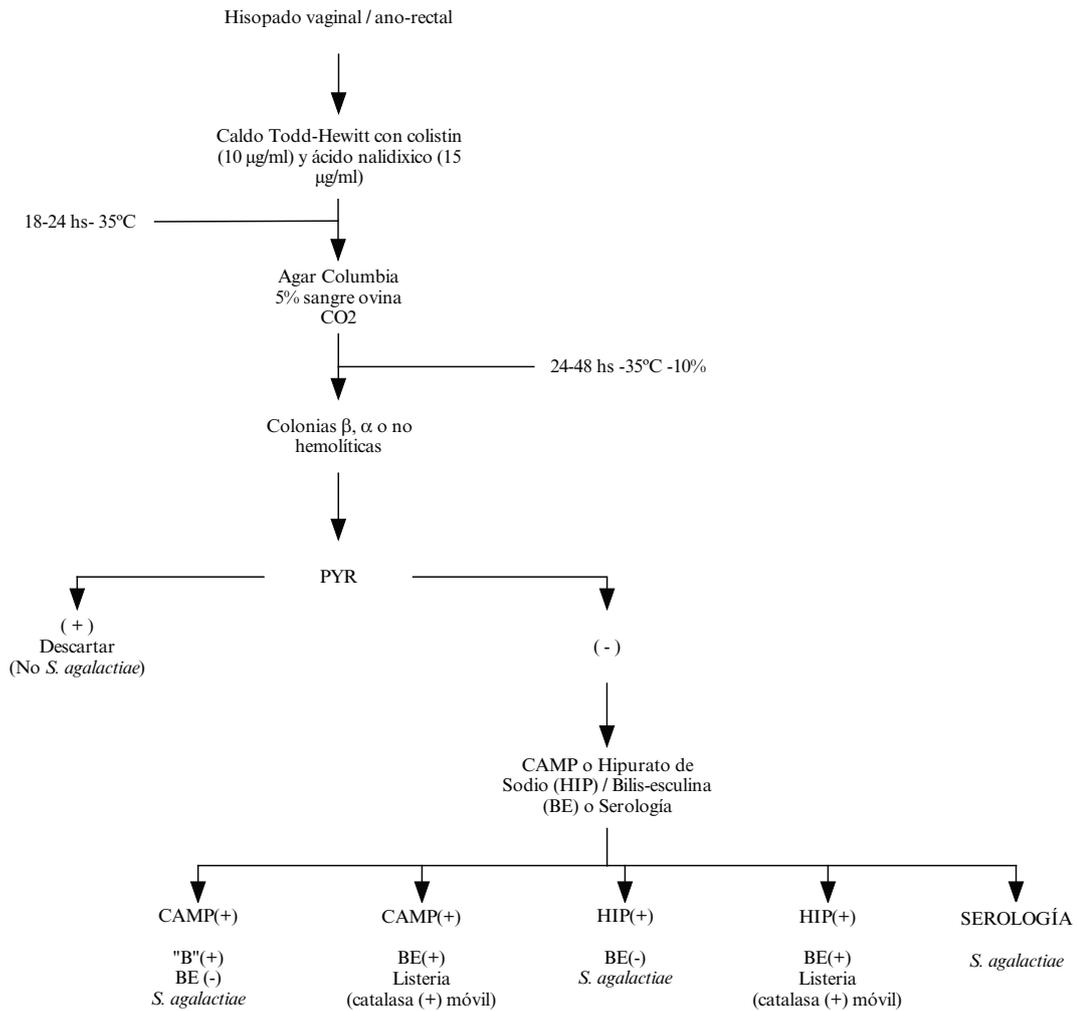
Lo recomendable es el procesamiento inmediato de las mismas debido al efecto deletéreo del paso del tiempo sobre el SGB, si esto no es posible, se deben conservar en medio de transporte STUART, AMIES o CARY BLAIR en los que la viabilidad bacteriana se mantendrá por 4 días a temperatura ambiente o en heladera (4-8°C).

● EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La siembra de una placa de agar sangre primario es OPTATIVA, ya que los hisopos que contienen las muestras deben ser sembrados en un medio selectivo que contenga antibióticos teniendo como objeto la disminución o eliminación de la flora acompañante.

El hisopo con la muestra se siembra en caldo Todd-Hewitt suplementado con (colistin 10 µg/ml y ácido nalidixico 15 µg/ml). Dejar cultivar el caldo por 18-24 hs. a 35°C y luego subcultivar en una placa de agar Columbia con 5% de sangre ovina.

Incubar por 18-24 hs a 35°C en atmósfera de CO₂ (puede ser en jarra con vela), luego hacer una primera inspección de las placas en búsqueda de colonias compatibles con SGB, hemolíticas y no hemolíticas, en caso negativo, incubar por otras 24 hs más y repetir la búsqueda.



Esquema 1. Esquema para búsqueda de SGB (Metodología propuesta por la Asociación Argentina de Microbiología).

● **LA IDENTIFICACIÓN DE SGB.**

Toda colonia de cocos grampositivos, β-hemolíticos o no (existen 2-5% de SGB con hemólisis α o no hemolíticos), prueba de la catalasa negativa, debe ser identificado tanto bioquímica como serológicamente.

● **LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS**

- A. Aglutinación con partículas de látex: las partículas de látex sirven para unir anticuerpos, que en este caso serán específicos contra carbohidratos de la pared de *Streptococcus* del grupo B (el antígeno). Cuando en una placa de vidrio o cartón pintado de fondo oscuro, se pone en contacto el antígeno con los anticuerpos correspondientes, se produce una aglutinación visible a simple vista que se interpreta como una prueba positiva.
- B. Coaglutinación: el fundamento de esta técnica es similar al anterior, la única diferencia radica en que como soporte se utiliza *Staphylococcus aureus* (cepa de Cowan) rico en proteína A capaz de unir los anticuerpos específicos por su porción Fc, dejando libre la porción Fab para reaccionar contra los antígenos. Al ponerse en contacto la

suspensión bacteriana con los anticuerpos específicos se producirá una aglutinación que se interpreta como prueba positiva.

ADVERTENCIA Los resultados deben interpretarse con cautela, pues aunque estas pruebas poseen alta especificidad pueden ocurrir reacciones cruzadas.

INFECCIONES DEL TRACTO GENITAL MASCULINO

En uretra: en el hombre es excepcional encontrar gérmenes con la morfología y tinción semejante a *Neisseria gonorrhoeae* y que no sean tales, por lo tanto el examen directo previa coloración de una muestra de uretra masculina con estos hallazgos, y la presencia de una reacción inflamatoria, permite realizar un diagnóstico presuntivo de blenorragia.

El hallazgo de numerosos polimorfonucleares y ausencia de gérmenes sugiere, en la mayoría de los casos, una uretritis de las llamadas inespecíficas.

En próstata: Ante la sospecha de infección tuberculosa, no es válida solamente la coloración de Ziehl-Nielsen con el material obtenido, puesto que la presencia de *Mycobacterium smegmatis* es muy frecuente. Sí, se exige el cultivo para *M. tuberculosis*.

En testículo: Como etiología frecuente encontramos *M. tuberculosis* y hongos diseminados, siendo raras las etiologías bacterianas comunes.

• URETRITIS NO GONOCÓCICAS (UNG)

Los siguientes microorganismos se aceptan como agentes etiológicos de uretritis no gonocócicas (UNG).

- Chlamydia trachomatis*
- Trichomonas vaginalis*
- Complejo GAM (*Gardnerella*, *Anaerobios*, *Mycoplasma*)
- Herpes virus hominis*
- Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma* spp.
- Candida albicans*
- Enterobacterias
- Anaerobios, etcétera.

• TOMA DE MUESTRA

1. Uretra: se extrae la muestra recomendando al paciente retraer el prepucio hacia atrás y volver hacia adelante con un suave masaje para facilitar la mayor salida de secreción. La misma se recogerá con ansa o hisopo estéril. En caso de que la secreción uretral sea escasa o nula se recogerá el primer chorro miccional de la mañana.
2. Próstata: para obtener material se realiza un masaje prostático (a través del ano).
3. Testículo y epidídimo: en estos casos está el masaje energético de epidídimo y próstata. Se recomienda que en este caso sea el urólogo quien haga la extracción.

• URETRITIS

Se deben estudiar las siguientes muestras en el siguiente orden:

- Secreción uretral (SU):** para el estudio de *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* y *Ureaplasma urealyticum*.
- Primera porción de la orina:** obtener el primer chorro miccional (entre 5-10 ml) con prepucio retraído, previa higiene de genitales externos. El primer chorro de orina se centrifuga inmediatamente (a 1000 rpm durante 10 minutos) en dos tubos estériles,

uno para cultivo y el otro para bacterioscopía. Esta muestra es útil para investigar *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia trachomatis*.

-Raspado uretral: (realizado con hisopo o bien con cureta oftalmológica) fundamentalmente intentar el estudio de *Chlamydia trachomatis*.

● **TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Idénticas consideraciones que para muestras del sexo femenino. Para el caso de primer chorro miccional o semen, transportarlo al laboratorio a la mayor brevedad posible a temperatura ambiente (NO refrigerar).

● **EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO**

Al igual que en las leucorreas este examen nos permitirá observar la presencia de leucocitos, piocitos, parásitos, células tipo guía (que nos recuerdan la presencia de *Gardnerella*), elementos micóticos.

● **EL GRAM DIRECTO**

La búsqueda estará orientada a diplococos gramnegativos de morfología y tinción tipo *Neisseria*, bacilos pleomórficos gramnegativos tipo *Gardnerella* u otra flora predominante.

● **CULTIVO DE LAS MUESTRAS**

Idénticas consideraciones que para muestras del sexo femenino, según sea el microorganismo a investigar.

Recordar que:

-la colonización penéana por *Candida* spp. es de un 20% de los varones parejas de mujeres con candidiasis recurrente, siendo más frecuente en los sujetos sin circuncisión. La colonización es generalmente en el surco balano-prepucial y la mayoría de los pacientes son asintomáticos.

-si bien no es común observar una cura espontánea en la mujer infectada por *T. vaginalis*, en el hombre puede ocurrir una descolonización espontánea del tracto urinario bajo en 3 semanas (posiblemente debido a la presencia de factores prostáticos presentes en la orina), salvo que ocurra una reinfección o infección crónica.

-en el sexo masculino la infección por *Chlamydia trachomatis* es una de las patologías sexualmente transmisibles más difundida, pudiendo participar como único agente o ser concomitante con otros patógenos, particularmente *Neisseria gonorrhoeae*.

Las infecciones genitales más comunes son: uretritis, epididimitis, proctitis sintomática y asintomática, prostatitis y linfogranuloma venéreo.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Asociación Argentina de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Entre Ríos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Infecciones genitales. Módulo 11. Imprenta Macagno S.R.L. Santa Fe. 1998.
- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison-Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison 2002-2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330homepage>
- Belli, L.; Padín, L. El laboratorio en las supuraciones genitales en las enfermedades de transmisión sexual. Arch Argen Dermatology 46:107-116. 1996.
- CDC. 1998 guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 47(RR-1):1-111. 1998
- Di Bartolomeo, S.; Leonino, A. P.; Rodríguez Fermepin, M.; de Torres, R. A. Balance del Contenido Vaginal (Bacova) en el diagnóstico diferencial de vaginosis-vaginitis. Reacción Inflamatoria Vaginal (Riv) en embarazadas sintomáticas. Acta Bioquim Clin Latinoamer 41(2):247-258. 2007.
- Di Bartolomeo, S.; Rodríguez Fermepin, M.; Sauka, D. H.; de Torres, R. A. Prevalencia de microorganismos asociados a secreción genital femenina, Argentina. Rev. Saude Publica. 36(5): 545-552. 2002.
- Eschenbach, D.; Pollock, H.; Schachter, J. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones del tracto genital femenino. En: Cumitech 17. Normas y Procedimientos en Microbiología clínica. Edición en español. Sociedad Americana de Microbiología, Washington, DC. 1983.
- Farinati, A. E.; Mormandi, J. O.; Tilli, M. Infecciones en Ginecología y Obstetricia. Del Diagnóstico al Tratamiento. Laboratorios Pfizer. 1998.
- Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia. Fundación Bioquímica Argentina. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Guía práctica integral (clínica-laboratorio) de diagnóstico de vaginosis-vaginitis en la atención primaria de la mujer en edad fértil. <http://www.fasgo.org.ar/guia.pdf>
- Gobernado, M.; López-Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. Enferm Infecc Microbiol Clin 21(Supl. 2): 54-60. 2003.
- Isenberg, H. D. (Ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM press, Washington D.C. 1998.
- Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente, Buenos Aires. Pautas para el diagnóstico y tratamiento de la ETS. Supuraciones genitales. Programa Nacional de ETS. 1987.
- Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A. Tenover, F. C.; Tenover, R. H. (Eds). Manual of Clinical Microbiology. 7th Edición. American Society for Microbiology, ASM Press. 1999.
- Nugent, R.; Krohn, M.; Hillier, S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 29(2):297-301.1991.
- Oviedo, P.; Quiroga, M.; Laczeski, M.; Pegels, E.; Marino, D.; Arce, L.; Vergara, M. Frecuencia de vaginosis bacteriana en embarazadas. VI Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. 12-13-14 de noviembre de 2007.
- PICTO (Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica Orientados) 2006-2008. Estudio de Infecciones Bacterianas Perinatológicas en la Provincia de Misiones.

Cátedra de Bacteriología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Código 36831.

- Proyecto de Investigación “Estudio de Infecciones Bacterianas Perinatológicas en Posadas, Misiones”. 2004-2006. Cátedra de Bacteriología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Código 16Q266.
- Quiroga, M.; Álvarez, O.; Pegels, E.; Oviedo, P.; Pereyra, E.; Vergara, M. Estudio comparativo de dos medios selectivos para la recuperación de *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. En prensa Revista de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.
- Quiroga, M.; Pegels, E.; Oviedo, P.; Pereyra, E.; Vergara, M. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B *Streptococcus* isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. *Braz J Microbiol* 39: 245-250. 2008.
- Smayevsky, J.; Fernández Canigia, L.; Lanza, A.; Bianchini, H. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. *Infect Dis Obstet Gynecol* 9 (1): 17-22. 2001.
- Spiegel, C. A. Bacterial vaginosis: Changes in Laboratory Practice. *Clin Microbiol Newsletter* 21(5): 33-37. 1999.
- Vázquez, F.; Otero, L.; Ordás, J.; Junquera, M. L.; Varela, J. A. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(7): 392-411. 2004.

GUÍA N° 3

Las Infecciones del Tracto Respiratorio

En la investigación de patógenos involucrados en las vías respiratorias superiores, tendremos muestras de sitios como garganta, nasofaringe, oído medio, senos paranasales y abscesos del espacio retrofaríngeo y será necesario considerar para las vías respiratorias inferiores, material de tráquea, bronquios, pulmones, pleura e incluso hemocultivos.

- Recordar que el laboratorista debe estar capacitado para responder a las siguientes preguntas:

1. datos de interés relacionados al paciente
2. qué muestra debo obtener
3. cómo y dónde la conservo hasta su procesamiento
4. cuál es el/los supuesto/s agente/s etiológico/s
5. cómo estudio microbiológicamente
6. qué informo- cómo informo y cuándo informo

INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS (IVR ALTAS)

• OTITIS MEDIA AGUDA (OMA)

Puede presentarse en forma exudativa (con derrame) acompañada o no, de perforación timpánica.

La única muestra VÁLIDA, para el estudio microbiológico de la OMA, es la punción del contenido del oído medio por timpanocentesis (en caso de tímpano íntegro).

El material debe ser extraído en forma estéril por el otorrinolaringólogo.

Esto implica, que debe RECHAZARSE la toma con hisopo de la secreción purulenta proveniente de oído medio.

La timpanocentesis debe ser considerada solo en los casos en los que se confirma la presencia de exudado retenido en las cavidades del oído medio y en determinadas situaciones:

- Huésped inmunocomprometido.
- Pacientes que no respondieron al tratamiento antimicrobiano inicial.
- Pacientes en estado crítico al comenzar la enfermedad.

La etiología es diversa y multifactorial. En adultos, como en niños, se recuperan con mayor frecuencia: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* no tipificables y *Moraxella catarrhalis*.

Los *Streptococcus pyogenes* grupo A (SGA), *Staphylococcus aureus* y bacilos gramnegativos, poco comunes en niños y adolescentes, pueden ser responsables de OMA en recién nacidos.

En el caso de aislar *Candida* spp., es conflictivo atribuirle rol etiológico.

OTITIS MEDIA CRÓNICA SUPURADA (OMCS)

Se la define como la infección del oído y mastoides, con otorrea a través de la membrana timpánica **no intacta (perforada)**, por más de 2 a 3 meses.

La única muestra válida para el estudio microbiológico de la Otitis Media Crónica (OMC) es la aspiración del contenido del oído medio.

Después de la perforación de la membrana del tímpano, el material debe ser extraído a través de la perforación timpánica por aspiración del exudado.

La obtención debe realizarse posterior a la limpieza y desinfección (alcohol 70%) del conducto auditivo externo con aguja.

La toma de muestra de la otorrea por hisopado auditivo externo no es adecuada.

Los microorganismos involucrados en esta patología difieren de los que producen OMA.

Los más frecuentes son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Para algunos autores, también los anaerobios (en especial *Bacteroides melaninogenicus*) cumplirían un rol relevante.

Tener en cuenta que *Pseudomonas* spp. por lo general, no da respuesta inflamatoria.

OTITIS EXTERNA

Infección del conducto auditivo externo, que puede presentarse en forma localizada, difusa, crónica o maligna.

Las muestras válidas para el diagnóstico son las obtenidas por: punción de absceso (si lo hubiera) o timpanocentesis.

Entre los agentes etiológicos se encuentran: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., anaerobios y *Pseudomonas aeruginosa*.

También pueden estar implicados: *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.

En el inmunocomprometido, la otitis externa maligna es una celulitis del conducto auditivo externo, aislándose generalmente *Pseudomonas aeruginosa*.

La toma de la muestra se realiza con hisopo, el que se coloca en un tubo tapa a rosca con 1 ml de solución fisiológica. Realizar siempre en paralelo, la extracción de hemocultivos seriados.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PUNCIÓN DE OÍDO MEDIO

Es importante que las muestras obtenidas por timpanocentesis (tímpano íntegro) o por aspiración del exudado del oído medio (si hay perforación), sean cultivadas lo más rápidamente posible.

Realizar:

Coloración de Gram: Informar respuesta inflamatoria y descripción morfológica y tinto-rial de los microorganismos.

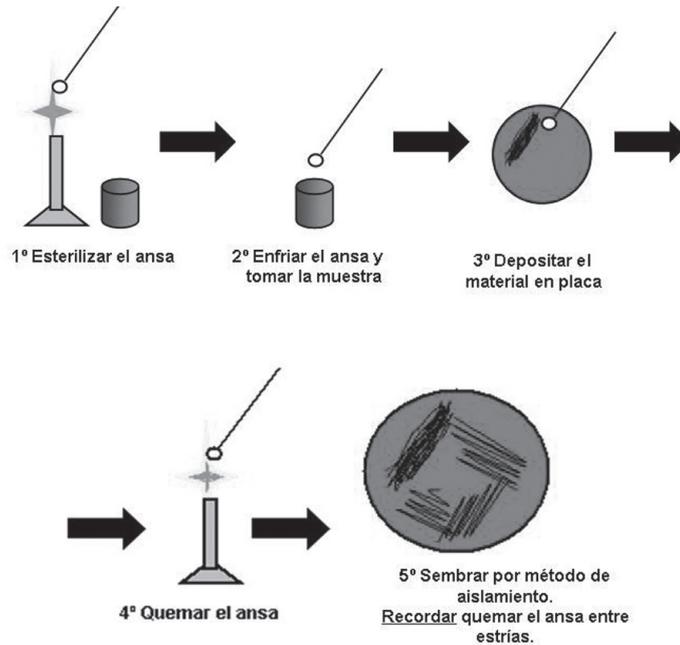


Figura 1. Esquema de técnica de siembra para aislamiento.

Siembra: Los medios de cultivo a utilizar dependen de la sospecha clínica y lo observado en la coloración de Gram. Por lo general se utilizan: agar sangre, agar chocolate y un agar lactosado (Ejemplo: Agar Eosina Azul de Metileno Levine: EMB Levine) en especial, cuando la muestra proviene de un neonato, donde la probabilidad de detectar bacilos gramnegativos es mayor. Adicionar un medio líquido como caldo tioglicolato o caldo cerebro corazón.

Incubación de las placas:

- Agar sangre y agar chocolate: a 35°C por 48 a 72 horas, en atmósfera de 3 a 10% de CO₂.
- Agar lactosado: a 35°C por 48 a 72 horas, en aerobiosis.
- Medios líquidos: a 35°C, incubar 5 a 7 días, con subcultivos a ciegas a las 24 hs.
- La siembra se realiza con técnica para aislamiento (Figura 1).

De ser posible, para el estudio de gérmenes anaerobios, se deben agregar medios para su aislamiento, como agar sangre con vitamina K y caldo sellado con parafina.

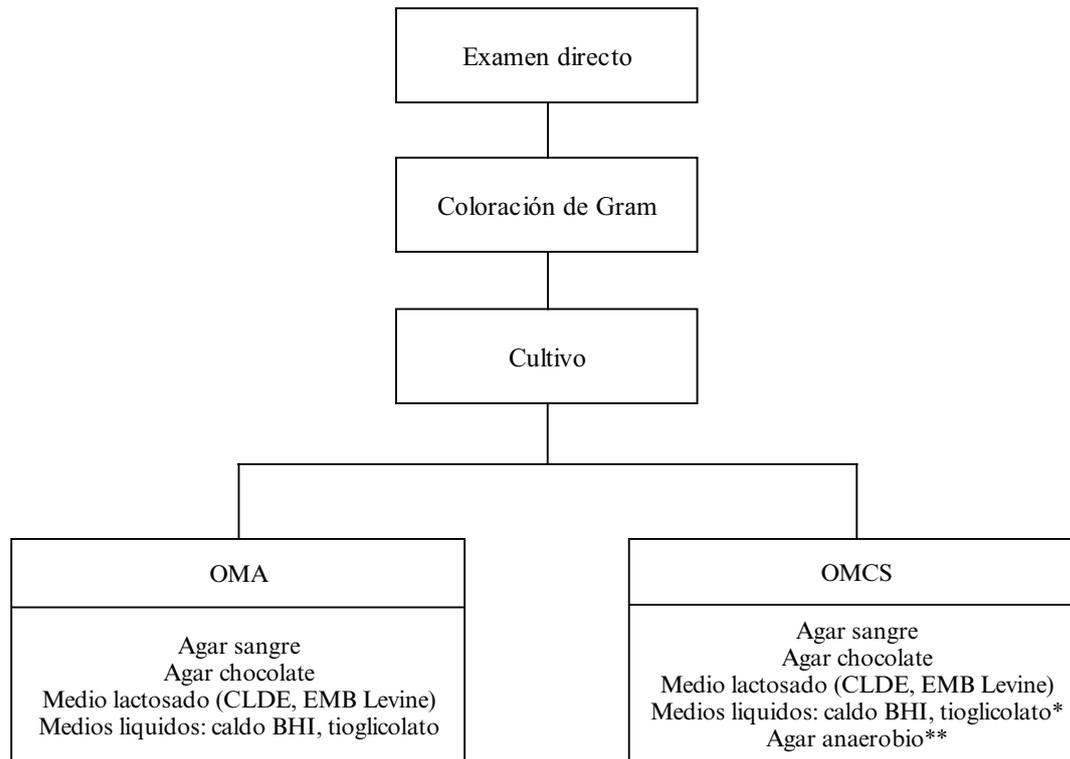
En el caso de pacientes HIV (+), agregar medios para cultivo micológico, como agar Sabouraud.

En caso de otitis bilateral, se debe cultivar el material de ambos oídos, ya que sólo en el 64% de los casos se tendrá el mismo microorganismo.

En el Cuadro 1 se representa en forma de esquema el procesamiento sugerido.

Tipificación: Según el desarrollo obtenido, se deberán realizar las pruebas bioquímicas y/o serológicas correspondientes a fin de identificar el agente etiológico. Para ello, se debe recurrir a manuales o tablas de identificación bacteriana.

Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos: Según el microorganismo aislado, la sensibilidad puede determinarse por difusión o por dilución, según corresponda.



Cuadro 1: Procesamiento de muestras de punción de oído medio.

● SINUSITIS AGUDA

Tanto en adultos como en niños, **los cultivos obtenidos de las narinas, del vestíbulo nasal o nasofaringe, no tienen correlación con la sinusitis.**

En casos agudos la muestra válida es la **punción sinusal**, realizada por el otorrinolaringólogo con dos fines, diagnóstico y terapéutico.

En los casos en que se sospeche de micosis, se deben estudiar muestras del seno afectado, obtenidas por vía endoscópica o a cielo abierto.

La punción sinusal es un procedimiento que no se realiza de rutina, estando indicada en:

- a. Huésped inmunocomprometido.
- b. Fallo terapéutico (según gravedad de la presentación).
- c. Complicaciones crónicas.

Los agentes etiológicos involucrados en la fase aguda de la sinusitis son semejantes a los observados en OMA: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

En forma semejante a lo que ocurre en OMCS, en la sinusitis crónica, aumenta la incidencia de anaerobios: *Peptostreptococcus* spp, *Prevotella* spp y *Propionibacterium acnes* (de dudoso significado clínico) y bacilos gramnegativos.

La flora anaeróbica es de frecuente hallazgo cuando existe un foco bucal.

En inmunocomprometidos hay que considerar la posibilidad de hongos filamentosos y mucorales.

En personas con fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* pasan a ser los agentes etiológicos más frecuentes.

Los cultivos obtenidos por punción de los senos maxilares deben ser cuantitativos, ya que recuentos mayores a 10^4 UFC/ml permiten diferenciar infección de colonización.

Los medios de cultivo a utilizar dependen de la sospecha clínica y lo observado en la coloración de Gram.

El procesamiento de la muestra es semejante al indicado en muestras de OMA.

● FARINGITIS ESTREPTOCÓCICA

La búsqueda está dirigida al diagnóstico de *Streptococcus pyogenes* (grupo A) (SGA), su agente etiológico.

El método de elección en el diagnóstico sigue siendo el cultivo de **hisopado de fauces**, contrariamente a lo descrito anteriormente en esta guía para otras patologías, donde el hisopo debe rechazarse.

Los métodos rápidos de detección de antígenos han cobrado, en los últimos años, un rol relevante por su alta sensibilidad, sencillez y rapidez de la técnica, permitiendo reducir y racionalizar los tratamientos antibióticos.

El estudio bacteriano de las faringoamigdalitis debe enfocarse entonces a la búsqueda de SGA.

Toma de muestra: la obtención de las secreciones faríngeas se realizará con escobillones o hisopos estériles y a nivel de las lesiones, frecuentemente de amígdalas, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano (los SGA son infrecuentemente detectables por cultivo luego de 18 a 24 horas de iniciado el tratamiento antimicrobiano).

Se deben utilizar dos hisopos: uno para cultivo y otro para detección directa de antígenos.

Si existe exudado, deberá recogerse; si existen falsas membranas, se extraerá el material de su periferia.

Técnica de obtención: con ayuda de un bajalengua, mantener baja la lengua del paciente y la garganta bien expuesta e iluminada, frotar enérgicamente con el hisopo la parte posterior de la misma, las amígdalas y toda parte donde haya inflamación exudado o ulceración.

Tener cuidado de no tocar con el hisopo labios y lengua.

El hisopo debe colocarse en un tubo seco estéril. SGA resiste a la desecación.

Dejar a temperatura ambiente. Sembrar inmediatamente. Si la siembra de la muestra demora más de 24 horas, se recomienda colocar el hisopo en medio de transporte Stuart, recordando que se pierde algo de rendimiento.

En la faringitis por *Streptococcus pyogenes*:

Recordar que

- En niños menores de 3 (tres) años, son escasas las posibilidades de aislarlos, debido a que la faringitis generalmente es de etiología viral.
- No hay relación entre la clínica y la cantidad de estreptococos aislados (no interesa la estría donde desarrollen), lo importante es su presencia o no, en el desarrollo de los cultivos.
- Se debe investigar también: *Streptococcus* grupo C y grupo G.

Diagnóstico

a) Directo - Rápido -

Por CoAglutinación, Látex o ELISA. Estos métodos tienen un alto valor predictivo positivo (sensibilidad menor a 90% y especificidad cercana al 100%), por lo que ante un resultado negativo, la muestra debe ser cultivada en medios adecuados.

Pueden aparecer reacciones cruzadas con *S. milleri* grupo A.

El examen por coloraciones o fresco de la muestra, no se recomienda en el diagnóstico de las faringoamigdalitis bacterianas clásicas, debido a que los agentes causales no se distinguen de la flora habitual de orofaringe, a excepción de la Angina de Vincent, donde la coloración de Gram es de importancia en el diagnóstico.

b) Cultivo

Debido a que se investigan microorganismos β -hemolíticos, se siembra en placas de agar sangre ovina, se cruza con un corte del medio de cultivo con el ansa, aumentando así el desarrollo de colonias en microaerofilia (Figura 2).

Incubar a 35°C por 24 horas, en aerobiosis o en atmósfera de 3 a 10% de CO₂ (puede utilizarse el método de recipiente con vela). Si no se observan, en 24 horas, colonias β -hemolíticas, la incubación debe prolongarse 24 horas más.

Ventajas de la sangre ovina

1. Mejor visualización de la hemólisis a las 24 horas.
2. Tiene menor cantidad de NAD libre lo que determina un crecimiento defectuoso de *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus*. Estos microorganismos crecen bien con sangre humana y pueden confundirse con estreptococos β -hemolíticos.
3. La sangre humana puede tener anticuerpos antiestreptococos y/o antiestreptolisina, que inhiban el desarrollo de estreptococos β -hemolíticos.

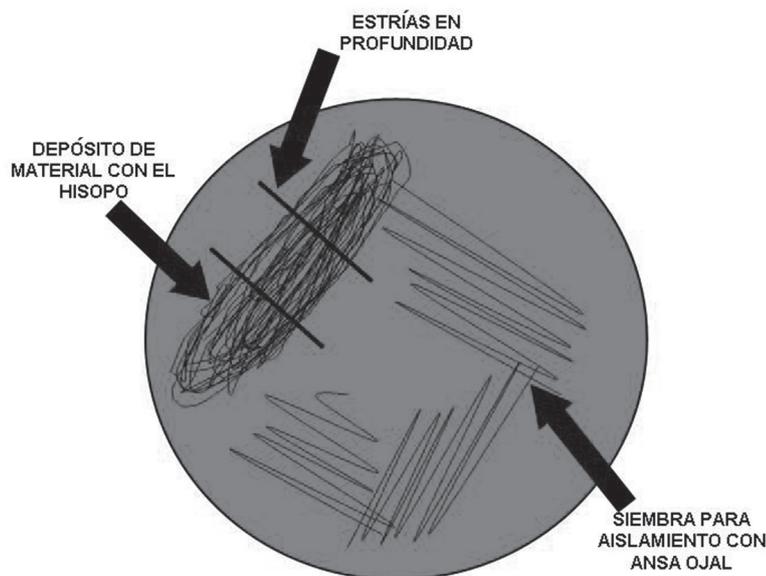


Figura 2: Procedimiento de siembra de hisopado de fauces.

4. Ausencia de riesgo biológico en su uso.

Desventajas de la sangre ovina

1. Costos elevados.
2. Dificil mantenimiento por el período de escasa estabilidad en el laboratorio.

c) Lectura e interpretación de los resultados

Una vez producido el desarrollo bacteriano, observar tipo de colonias (morfología, disposición, consistencia, tamaño, hemólisis, etcétera).

Inicialmente, realizar coloración de Gram y prueba de catalasa, a colonias β -hemolíticas de cocos grampositivos.

Streptococcus pyogenes se observa como cocos grampositivos, catalasa negativo.

Es además:

- Bacitracina sensible.
- Prueba de PYR positiva.
- Prueba de Voges-Proskauer positiva (se utiliza para casos dudosos).

Las pruebas serológicas, pueden realizarse buscando antígenos de los grupos A, C, y G.

En el Cuadro 2 se observa la metodología diagnóstica.

Para la tipificación se utilizan pruebas bioquímicas y serología.

Toma de muestra

- Hisopado de pared posterior de faringe y amígdalas
- Conservación: Temperatura ambiente (menos de 24 horas)
- Para transporte: Medio de Stuart o semejante

Examen directo (Coloración de Gram)

- Carece de importancia (No se realiza ni informa)
- Solo es útil en Angina de Vincent y candidiasis oral

Cultivo

- Aislamiento en agar sangre ovina/humana
- Búsqueda de colonias β -hemolíticas
- Identificación bioquímica-serológica

Incubación

- 48 horas (Observar a las 24 horas)

Sensibilidad

- No se realiza, excepto alergia a antibióticos β -lactámicos

Cuadro 2: Resumen diagnóstico de faringitis bacteriana.

Recomendaciones para la optimización del método de cultivo:

Diversos autores recomiendan, para obtener una mayor sensibilidad, usar las siguientes alternativas:

- a. Agar sangre ovina, anaeróbicamente, durante 48 horas.
- b. Agar sangre ovina, en aerobiosis, con cortes perpendiculares en las primeras estrías, durante 48 horas.
- c. Agar sangre ovina con trimetoprimasulfametoxazol (TMS), en 3 a 10% de CO₂, durante 48 horas.
- d. Agar sangre ovina con TMS, en anaerobiosis, durante 48 horas.

Falsos negativos del diagnóstico por cultivo

- a. Tratamiento antibiótico previo.
- b. Toma de muestra incorrecta.
- c. Metodología inadecuada.

Falsos positivos en el diagnóstico por cultivo

- a. Paciente portador de *S. pyogenes* cursando faringitis de diferente etiología (ejemplo: viral). Se identifica por niveles no aumentados de antiestreptolisina O en suero.
- b. Estreptococos β-hemolíticos de otros grupos que pueden dar positiva la prueba de la bacitracina. Se diferencian por ser PYR y/o serología negativos, por lo que es importante realizar estas técnicas.
- c. Por falta de realización de coloración de Gram a las colonias β-hemolíticas y desarrollo de *Arcanobacterium haemolyticum* o *Haemophilus haemolyticus* en agar sangre humana. Se evita utilizando agar sangre ovina.

d) Sensibilidad antibiótica

Aún no ha sido detectada la resistencia a penicilina, en *S. pyogenes*, la droga de elección en el tratamiento, por lo que de rutina no se deben realizar ensayos de sensibilidad a esta droga. Solo se realiza con fines epidemiológicos y de investigación.

De ser necesario implementar la terapia con macrólidos (en pacientes alérgicos a penicilina), se debe estudiar la sensibilidad a los mismos, debido al aumento de la resistencia en algunos informes.

e) Informe

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos.

Respecto al informe correspondiente al exudado de fauces, se ha propuesto el que se muestra en la Tabla 1.

• OTRAS ETIOLOGÍAS BACTERIANAS Y SITUACIONES ESPECIALES**1) Faringitis gonocócica**

Ante sospecha por hábitos sexuales del paciente, sembrar la muestra en Thayer Martín y agar chocolate e incubar 48 a 72 horas en 3 a 10% de CO₂. Siempre acompañar con los medios necesarios para la búsqueda de *S. pyogenes*. Se debe realizar tipificación y sensibilidad según metodología adecuada.

Tabla 1: Modelo de informe de análisis bacteriológico.

| | |
|---|--|
| Exudado de fauces | |
| Examen microscópico | |
| Coloración de Gram: cualitativa/cuantitativa | Si en asociación fusoespirilar y candidiasis bucofaringea. No se hace de rutina. |
| Resultado | Negativo No se obtuvo desarrollo de Estreptococo β - hemolítico. Flora habitual. |
| | Positivo Desarrollo de <i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A). Estreptococo β -hemolítico No Grupo A. (1) Estreptococo C o G con sus respectivas especies. (1) Desarrollo de otros agentes etiológicos de faringitis. |
| Pruebas de sensibilidad | No se realiza de rutina, solo se prueban macrólidos en pacientes alérgicos a penicilina. |

(1) Descartando *S. anginosus***2) BÚSQUEDA DE CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE:**

Se debe obtener parte de la membrana adherente con pinza estéril o hisopar enérgicamente la zona afectada.

El procesamiento debe ser inmediato.

Examen directo

El diagnóstico de difteria, basado en el examen microscópico de la muestra en un frotis coloreado, carece de valor, dado que puede obtenerse resultados falsos, positivos o negativos.

El diagnóstico de difteria es **clínico** debido a la urgencia.

El laboratorio cumple una importante función en el diagnóstico con fines epidemiológicos y de investigación, pues debe aislar la cepa y demostrar la producción de toxina, lo que insume un tiempo no útil en el urgente diagnóstico y tratamiento.

Coloración de Gram

Se realiza en la forma habitual y solo se puede informar la presencia o no de “**difteroides**”, es decir de bacilos grampositivos que se parecen y pueden confundir con *C. diphtheriae* y son presumiblemente especies de *Corynebacterium*.

Los difteroides son bacilos grampositivos pleomórficos, se tiñen irregularmente y pueden contener gránulos metacromáticos (polifosfatos), detectables con la coloración de Albert. Las células pueden disponerse en empalizada o en V, semejando configuraciones cuneiformes o “letras chinas”.

O sea, un informe donde se observa flora compatible con *Corynebacterium*, sería: “**Se observan bacilos grampositivos de morfología, coloración y disposición que recuerda a Corynebacterium**”.

Cultivo y Determinación de toxigenicidad

Dada la importancia epidemiológica del diagnóstico se realizan en Laboratorios de Referencia.

3) Búsqueda de Angina de Vincent (Asociación fuso-espirilar)

La Angina de Vincent es una infección sumamente rara, pseudomembranosa o ulcerativa de las encías, boca o faringe, generalmente unilateral; aparece en pacientes con higiene deficiente de boca.

Puede reconocerse por lesiones ulcerativas grises de la faringe posterior, olor fétido del aliento del paciente y por el frotis coloreado por técnica de Gram.

La toma se debe realizar a nivel de la falsa membrana.

Hacer un frotis y teñirlo por el método de Gram.

El diagnóstico se basa en el examen microscópico directo de este frotis coloreado.

Se observa asociación de dos gérmenes, presentes en gran abundancia: bacilos gramnegativos fusiformes, anaeróbicos, muy largos (6 a 12 micras), en forma de huso, y por otro lado, espiroquetas gramnegativas, finas y onduladas: la asociación fuso-espirilar.

Como estos organismos muy rebeldes se encuentran normalmente en la boca, el cultivo no ayuda al diagnóstico.

El tratamiento se debe iniciar en base a la clínica y la coloración de Gram.

Es muy importante diferenciar las pseudomembranas de la Angina de Vincent con la lesión similar de la difteria.

4) Búsqueda de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR)

Este análisis no debe realizarse de rutina, ya que un alto porcentaje de personas sanas son portadores de SAMR.

Se justifica su estudio en presencia de un brote epidemiológico nosocomial o previo a una cirugía.

En el caso de brotes, la búsqueda solo debe realizarse en las personas involucradas.

Se realiza hisopando las fosas nasales anteriores.

La siembra puede realizarse en agar sangre, agar chocolate o agar manitol salado.

La búsqueda está dirigida **exclusivamente** a la detección de SAMR, es decir, que **solo se debe** ensayar la sensibilidad frente a los β -lactámicos, utilizando oxacilina y/o cefoxitina como marcadores.

El disponer de medios cromogénicos posibilita el diagnóstico de SAMR en 24 horas.

Recordar que la existencia de un brote por meningococos, moviliza a su pesquisa en fauces para erradicar la portación.

INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS BAJAS (IVR BAJAS)

• CONSIDERACIONES GENERALES

- a. Para una evaluación de la muestra que permita orientar hacia el agente etiológico y seleccionar los medios de cultivo apropiados, es importante saber si:
 - el paciente está internado o es ambulatorio.
 - el paciente está sometido o no a ARM.
 - es inmunosuprimido.
 - tiene enfermedad fibroquística del páncreas.

| Score | Gram | Cultivo | Clínico |
|--------------------|------|---------|---------|
| <i>S. pyogenes</i> | | X | |
| Angina de Vincent | X | | |
| Difteria | | | X |

Cuadro 3: Metodología diagnóstica de faringitis según etiología.

- está recibiendo antibióticos y cuáles.
 - si el proceso pulmonar es crónico. En este caso debería realizarse de rutina la búsqueda de otros microorganismos (micoplasmas, hongos).
- b. La microscopía directa brinda datos muy importantes, la presencia de células epiteliales escamosas (CEE) es indicadora de contaminación orofaríngea; los leucocitos polimorfonucleares (PMN) acompañan la respuesta inflamatoria, no siempre de origen infeccioso. Además hay que observar si existen bacterias predominantes y células fagocíticas conteniendo bacterias intracelulares y orientar hacia qué medios de cultivo utilizar (Ejemplo: la visualización de bacilos gramnegativos obliga a sembrar la muestra además en un agar lactosado).
 - c. Idealmente las muestras deben tomarse antes de iniciar el tratamiento antibiótico, el que disminuye considerablemente la sensibilidad y especificidad de los cultivos.
 - d. La toma de hemocultivos es importante para un valor diagnóstico y pronóstico de una neumonía. También puede ayudar a interpretar recuentos dudosos con las técnicas cuantitativas. Tienen relativa especificidad debido a que pueden coexistir otros focos y baja sensibilidad por el elevado número de falsos negativos.
 - e. Siempre que se cuente con la metodología, se deben investigar otros agentes: *Legionella pneumophyla*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

Muestra

Muestras Cuestionables

- Esputo
- Secreción Traqueal

Muestras Incuestionables

- Líquido de Punción Pleural
- Hemocultivos
- Broncoscopía con cepillo protegido
- Lavado brocoalveolar

La muestra más accesible es el **esputo** y por lo tanto se deben extremar los cuidados al trabajar con la misma.

Tener en cuenta que las muestras más fáciles de obtener suelen ser las más difíciles de evaluar.

Su estudio presenta claramente ventajas y desventajas:

Ventajas

- Muestra de extracción no invasiva, inocua, fácil y accesible para el paciente, con excepción de aquellos que no pueden expectorar.

Desventajas

- Contaminación con flora habitual y/o colonizante, transitoria, de orofaringe, la que a su vez puede ser agente del proceso infeccioso. Se corrige efectivamente esta desventaja, jerarquizando la muestra.
- Su utilidad es muy discutida en pacientes con neumonía hospitalaria, por su baja especificidad, debido a la colonización de la vía aérea superior con bacilos gramnegativos y estafilococos.

- Muestra no válida para anaerobios, dado que atraviesa orofaringe donde los anaerobios son colonizantes.

Instrucciones para la obtención de esputo

La muestra obtenida por expectoración es una de las más importantes para el diagnóstico microbiológico de la neumonía de la comunidad. Las indicaciones dadas al paciente para la toma de muestra deben ser claras y precisas, evitando el uso innecesario de vocabulario técnico.

- Al despertar a la mañana, lavarse las manos y enjuagar la boca con bicarbonato y depositar, en un envase estéril, material que proceda del interior de los pulmones, no debe ser exclusivamente saliva ni secreción nasofaríngea.
- Para ello:
 - Inspirar profundamente.
 - Retener por un instante el aire en los pulmones.
 - Lanzarlo violentamente hacia afuera con un esfuerzo de tos.
 - Repetir esta operación hasta obtener por lo menos tres esputos, dentro del envase que se ha entregado, evitando que se escurra por sus paredes exteriores.
 - Tapar firmemente el frasco.
 - Si algo se ha escurrido por las paredes, limpiar con papel que se debe quemar inmediatamente, pues está contaminado.
 - Lavarse las manos y colocar el envase en una bolsa con hielo o en heladera (no congelador ni freezer).
 - Enviar al laboratorio.
 - Cuidar que la boca del frasco esté siempre hacia arriba.
 - Transportar al laboratorio en cadena de frío.

Transporte y conservación de la muestra

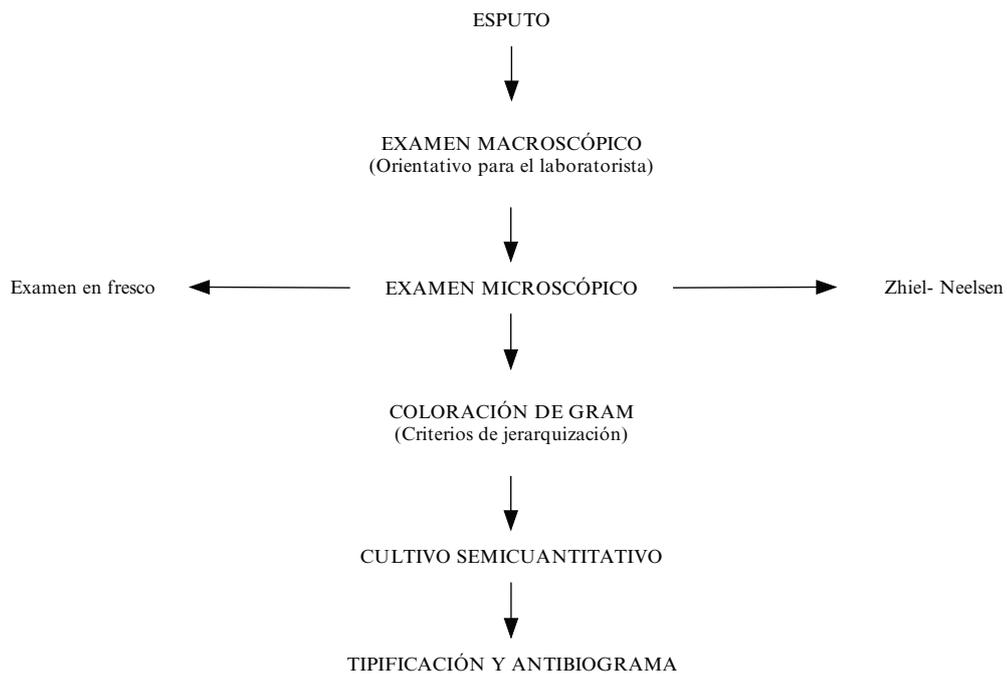
Los especímenes deben llevarse al laboratorio lo más rápido posible, idealmente dentro de los 30 minutos de obtenidos, debiendo ser procesados de inmediato.

Si no pueden procesarse en este lapso, se deben conservar en heladera (no en congelador ni freezer), donde pueden permanecer hasta 12 horas.

Recordar que el frío prolongado atenta contra algunos microorganismos como *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

No dejar la muestra a temperatura ambiente, pues algunas bacterias como *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, pierden sus caracteres morfológicos y tintoriales al quedar a temperatura ambiente en contacto con bacteriocinas de otras bacterias y la acción de leucocitos, siendo además considerable el sobrecrecimiento de enterobacterias, BNF (Bacilos Gramnegativos No Fermentadores) o levaduras de crecimiento rápido que, al multiplicarse, conduce a errores en el diagnóstico.

Reiteramos que el frío por períodos prolongados atenta contra la viabilidad de algunos microorganismos y la temperatura ambiente es perjudicial por lo ya comentado.



Esquema 1: Esquema de procesamiento de muestras de esputo.

Esputo

a. Observación macroscópica:

Observar el aspecto macroscópico de la muestra (presencia de saliva, sangre, color, olor, consistencia). **Estos elementos deben ser considerados solo como guías para el laboratorista ya que los tratamientos previos pueden modificarlos, no permitiendo asociar las características macroscópicas con ciertos gérmenes en forma categórica.**

Así, por ejemplo, la “sospecha” de *Klebsiella* spp. o la fermentación de restos alimenticios da al esputo un aspecto espeso, pegajoso y verdoso y un proceso por organismos anaeróbicos es acompañado de olor fétido.

Estos elementos solo sirven como ayuda.

b. Examen microscópico

Todos los especímenes, que son expectorados espontáneamente u obtenidos mediante broncoaspiración o aspiración traqueal por nariz o por boca, están sujetos a contaminación por la flora oral.

Coloración de Gram (Criterios para jerarquizar la muestra):

- Evaluar si la muestra es significativa: Existen diferentes criterios para jerarquizar.
- El más aceptado tiene en cuenta la presencia de **más de 25 leucocitos polimorfonucleares (PMN) y menos de 10 células epiteliales por campo 100X.**
- Efectuar una descripción de la reacción tintorial, morfología y disposición de los microorganismos y de la flora predominante utilizando objetivo de inmersión (1000X).

Tener en cuenta:

- No pretender dar nombres a los gérmenes observados en un simple examen microscópico directo del esputo.

- No omitir las grandes formas de hongos que se encuentran o la presencia de levaduras y pseudomicelios.
- Atender a la presencia de formas finas y filamentosas de *Actinomyces* y *Nocardia*.
- A menudo, el extendido coloreado por el método de Gram es útil para diferenciar la infección bacteriana de la colonización o contaminación.
- La presencia de leucocitos PMN con una gran densidad de microorganismos nos hace sospechar de infección.
- La ausencia de dichas células y presencia de microorganismos podría deberse a una contaminación, o si se reitera este hallazgo, una colonización.
- Relacionar estos datos siempre con los datos clínicos.
- Realizar siempre coloración de Ziehl-Neelsen.
- Recordar la importancia de lo observado en la coloración de Gram, en pacientes internados y ambulatorios graves, que de ser categórica (flora única desplazante o franco predominio) permite definir el tratamiento empírico inicial, mientras se espera el cultivo, identificación y sensibilidad.

c. Cultivos semicuantitativo:

Sembrar:

- Placas de agar sangre en atmósfera 3 a 10% de CO₂ (puede usarse el método de recipiente con vela).
- Placas de agar chocolate en atmósfera 3 a 10% de CO₂ (puede usarse el método de recipiente con vela), cuando se sospecha de microorganismos exigentes, como *Haemophilus influenzae*, ya sea por la visualización de estructuras morfológicamente compatibles en la coloración de Gram o por clínica y epidemiología.

Se pueden utilizar como medios de aislamiento, además:

- Agar sangre: Realizar la prueba de satelitismo con la inoculación de una cepa de *Staphylococcus* spp., microorganismo capaz de producir el factor V.
- Agar chocolate con Isovitalex.
- Levinthal's Agar: cualquiera sea el medio utilizado observar las colonias con lupa.
- Medios selectivos para bacilos gramnegativos, ante su sospecha u observación en la coloración de Gram, como flora predominante.

Espeto: Cultivo semi-cuantitativo

Para realizar un cultivo semi-cuantitativo, la muestra de esputo debe sembrarse de la siguiente manera:

- Tomar una ansada de la muestra seleccionando las partes purulentas o mucopurulentas. Si la consistencia de la misma hace difícil la toma, verter el esputo en una placa de Petri estéril, para mejor selección de la porción a sembrar.
- Sembrar la placa como se muestra en la figura 3. Se sugiere orientar la cuarta estría en sentido diferente a las demás, para facilitar su ubicación, al momento de evaluar los cultivos o identificarla correctamente.

Recordar no quemar el ansa entre estrías.

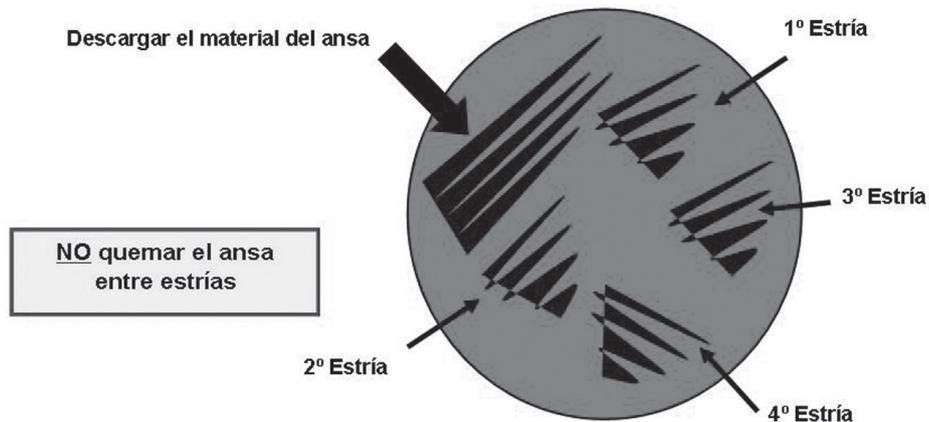


Figura 3. Metodología de siembra semicuantitativa.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

Una vez producido el desarrollo, luego de la incubación a 35°C por 24 a 48 horas, observar y estudiar las colonias que se encuentran en predominio (más de cinco colonias de aspecto semejante) en la 4ª estría.

Definir tipo de colonias (morfología, color, disposición, consistencia, tamaño, hemólisis en agar sangre, crecimiento difuso, predominio) y realizar coloración de Gram.

Establecer, luego de la observación macro y microscópica de las colonias desarrolladas, los pasos a seguir para la tipificación y sensibilidad del microorganismo hallado.

Recordar:

- Cultivo para *Mycoplasma* cuando es solicitado y posible de realizar.
- Cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* y hongos, si se sospecha de ellos y es solicitado.
- Cultivo para *Bordetella pertussis*, si lo solicita el médico ante sospecha. Esta siembra se realiza al pie de la cama del paciente, por la labilidad de este germen, en medio de Bordet Gengou.

Recordar que las únicas muestras válidas para el estudio de anaerobios, en las infecciones de las vías respiratorias bajas, son las obtenidas por punción (transtraqueal, pulmonar o pleural) o por fibrobroncoscopia con cepillo protegido.

Cultivo de secreciones

Se ha buscado mejorar la especificidad del cultivo de secreciones realizando:

- * Técnicas cuantitativas con un punto de corte mayor a 10⁶ UCF/ml.
- * Muestras protegidas, tomadas por fibrobroncoscopia.

Muestras obtenidas por fibrobroncoscopia

En pacientes intubados con o sin ARM, las muestras obtenidas a través del tubo endotraqueal no son recomendables, ya que es frecuente el hallazgo de bacterias colonizantes (frecuentemente multirresistentes como *Acinetobacter* spp. u otros BNF).

La broncoscopia con cepillo protegido reduce sensiblemente el arrastre de bacterias de la orofaringe pero no las elimina totalmente, por ello es indispensable realizar el recuento de colonias.

Cepillo Envainado o Protegido (CEP)

Con el objeto de evitar la contaminación orofaríngea, se ha desarrollado un sistema de doble catéter, con cánulas telescópicas y un tapón distal.

El cepillo envainado será colocado por el neumonólogo en un tubo a rosca estéril. Los especímenes deben ser procesados dentro de los 30 minutos de su extracción, no debiendo superarse las 2 horas dado que la muestra obtenida es escasa (0,01 a 0,001 ml) y está sometida a desecación.

Recordar que no debe dejarse a temperatura ambiente, pues el recuento de colonias no tendría valor.

Recordar que debe colocarse de inmediato en heladera (4 a 8°C), donde puede permanecer hasta 24 horas.

Se incuban las placas de agar sangre y agar chocolate (atmósfera húmeda, con 3 a 10% de CO₂), agar lactosado en aerobiosis y agar anaerobio, en atmósfera de anaerobiosis, durante al menos 72 horas a 35°C.

Es importante tener en cuenta que la solución fisiológica puede ser inhibitoria para *Legionella* spp. y disminuye los recuentos de anaerobios, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, por lo que para la realización de las diluciones es recomendable utilizar agua estéril o caldo tripteína soya.

Criterios de jerarquización

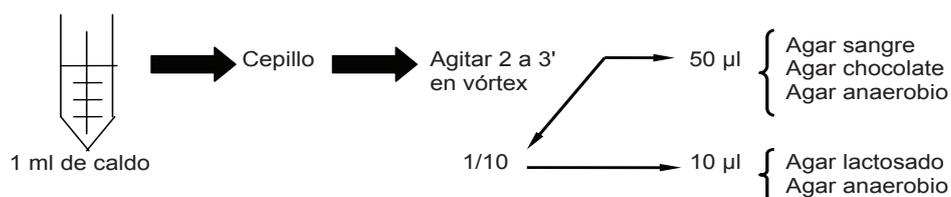
Puntos de Corte (PC):

- $\geq 10^3$ UFC/ml en pacientes sin tratamiento antibiótico previo.
- $\geq 10^2$ UFC/ml en pacientes con tratamiento antibiótico previo.

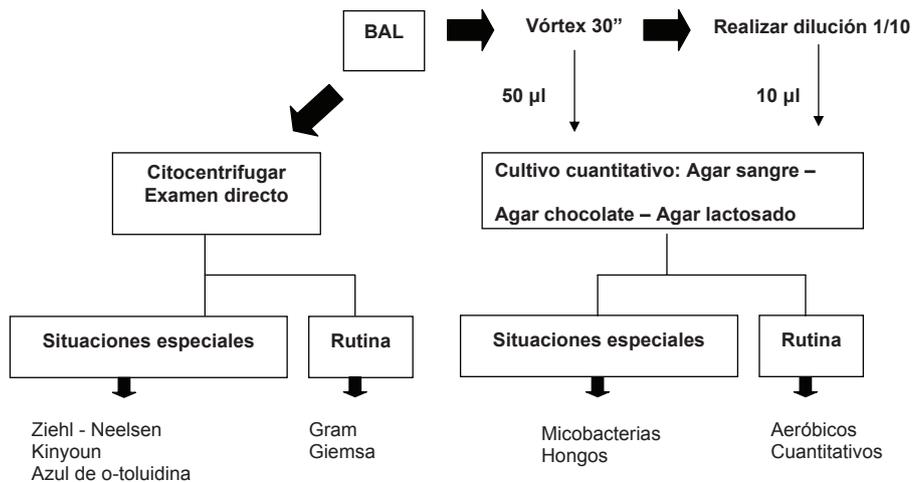
Debido a la escasa superficie alveolar que se rastrilla, el CEP no es apto para la búsqueda de *M. tuberculosis* ni de hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *P. braziliensis*, y otros).

Lavado Broncoalveolar (BAL)

Se lava un segmento pulmonar con líquido estéril. Es importante que se envíen por separado (2 o 3 jeringas diferentes) las fracciones que se recuperan, ya que la primera es la más contaminada por lo que tiene un valor semejante a las secreciones traqueales para investigar gérmenes habituales.



Esquema 2. Metodología de siembra para muestras obtenidas por CEP.



Esquema 3. Procesamiento para muestras obtenidas por BAL.

Los especímenes, de no ser procesados dentro de los 30 minutos de su extracción, pueden conservarse en heladera (4 a 8°C) hasta 24 horas, sin que se altere significativamente el recuento bacteriano.

Es importante que se envíe el dato de los mililitros de volumen instilado y de los mililitros de volumen recuperado, a fin de realizar el recuento.

Recordar que no debe dejarse a temperatura ambiente, pues el recuento de colonias no tendría valor.

Recordar que deben colocarse de inmediato en heladera (no congelador ni freezer), donde puede permanecer hasta 24 horas.

Las placas de agar sangre y agar chocolate (atmósfera húmeda, con 3 a 10% de CO₂) y agar lactosado (aerobiosis) se incuban durante al menos 72 horas a 35°C.

Para la realización de las diluciones, es recomendable utilizar agua estéril o caldo trip-teína soya, por lo comentado anteriormente.

Criterios de jerarquización

Puntos de Corte (PC):

- $\geq 10^4$ UFC/ml en pacientes sin tratamiento antibiótico previo
- $\geq 10^3$ UFC/ml en pacientes con tratamiento antibiótico previo y $\leq 1\%$ de células epiteliales escamosas

Tener en cuenta que:

- Si el porcentaje (1%) de células epiteliales escamosas, contando al menos 200 a 300 elementos entre macrófagos, PMN y células epiteliales escamosas, se supera, se estaría en presencia de una muestra contaminada por secreciones de las vías aéreas superiores.
- La presencia de células ciliadas bronquiales también podría ser considerada un indicio de contaminación

- Si no se observan macrófagos ni PMN, podría deberse a una muestra muy diluida, o bien que no se trate de neumonía (ya que es improbable en pacientes no neutropénicos) o deberse al sitio de donde se tomó la muestra.
- Es útil buscar la presencia de bacterias intracelulares, ya que tienen una alta correlación con infección aguda.

El BAL posee una serie de ventajas sobre el CEP:

Ventajas

- La muestra tiene mayor volumen lo que permite la realización de diferentes técnicas diagnósticas.
- Está menos afectada por el uso previo de antibióticos, probablemente por el volumen recolectado y las diluciones realizadas.
- Es válida para la búsqueda de micobacterias y hongos.
- Es de bajo costo.

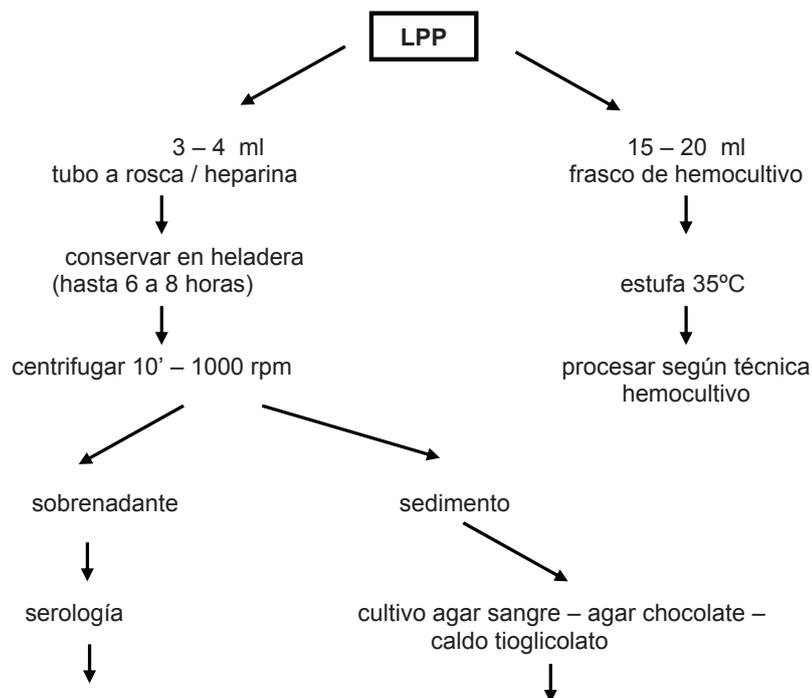
Desventajas

- El ser una muestra no apta para el estudio de anaerobios.
- La toma de muestra se realiza a ciegas (el material recogido podría provenir de un sitio no afectado).

Líquidos de punción: Líquido de Punción Pleural (LPP), Punción Transtraqueal (PTT) y Punción Pulmonar Percutánea (PPT)

Se las utiliza cuando:

- no se pudo llegar a un diagnóstico estudiando el esputo
- los pacientes no tienen respuesta al tratamiento instaurado



Esquema 4. Procesamiento de LPP.

- se sospecha la presencia de anaerobios
- existe derrame pleural

La muestra más utilizada es el LPP, ya que las otras dos poseen contraindicaciones (pacientes intubados, hemoptisis, etcétera).

Las placas con medios sólidos y los tubos con medios líquidos, se incuban según corresponda (atmósfera húmeda con 3 a 10% de CO₂ o aerobiosis) durante al menos 72 horas a 35°C.

Debe informarse el aislamiento de cualquier germen.

Tener precaución con aquellos que solo crecen en medios líquidos y que sean flora habitual de piel, ya que probablemente representen una contaminación.

En caso de gérmenes de crecimiento habitual en medios líquidos y sólidos, los medios líquidos nos sirven de control. Por ejemplo gérmenes poco exigentes: Enterobacterias, *Pseudomonas* spp., estafilococos o enterococos.

Si gérmenes poco exigentes desarrollan sólo en los medios líquidos y no lo hacen en los sólidos, es necesario supervisar los cultivos, ya que podría deberse a errores en la técnica de siembra o contaminaciones.

Recordar que toda muestra, para el estudio de neumonía, debe ser acompañada de hemocultivos, ya que clarifican la interpretación de los recuentos intermedios, ayudan a la orientación hacia otro foco posible de bacteriemia y colaboran en la identificación del agente etiológico en más del 20% de los pacientes con esta patología.

Recordar que frente a cultivos polimicrobianos cada probable agente etiológico debe ser estudiado individualmente (tipificación y sensibilidad antimicrobiana).

Estudio de Sensibilidad Antimicrobiana

De producirse el aislamiento de cocos grampositivos, enterobacterias o BNF, como agentes etiológicos de infecciones del tracto respiratorio, se debe recurrir al ensayo de la sensibilidad.

Informes

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos. Respecto al informe correspondiente a muestras de las vías respiratorias inferiores, se han propuesto los que figuran en Tablas 2 y 3.

• ESTUDIO DE *Mycobacterium tuberculosis*

Recolección de muestras

El mayor problema en la recuperación de micobacterias de muestras clínicas, es la presencia de gran número de contaminantes. Este problema se resuelve parcialmente, obteniendo muestras frescas y refrigerando cualquier muestra que no se puede procesar de inmediato.

El buen cultivo exige la mejor muestra posible.

Con las instrucciones mencionadas anteriormente, para el estudio de tuberculosis (TBC) en muestras de esputo, se deben procesar por lo menos tres muestras, recogidas en días sucesivos (por la intermitencia en la eliminación bacilar).

Tabla 2: Modelo de informe para BAL.

| Espuito/ Aspirado traqueal | | | |
|---|-------------------------------|--|------|
| Examen microscópico: | | | |
| Examen en fresco (100x) | Células epiteliales escamosas | > 10 | < 10 |
| | Leucocitos | > 25 | < 25 |
| Coloración de Ziehl Neelsen: | Negativa | | |
| | Positiva | 1. (+) menos de 1 BAAR por campo en 100 c/observados 2. (++) entre 1 y 10 BAAR por campo en 50 c/observados 3. (+++) más de 10 BAAR por campo en 20 c/observados | |
| Rto. de colonias: cuantitativo UFC/ml (sólo en aspirado traqueal) semicuantitativo | | | |
| Resultado: | Negativo | 1. Flora habitual 2. Muestra no representativa 3. Flora polimicrobiana | |
| | Positivo | Género y especie del patógeno potencial | |
| Prueba de sensibilidad | | | |

Tabla 3: Modelo de informe para BAL.

| <i>Lavado broncoalveolar</i> | | | |
|--|--|--|------|
| <i>Examen microscópico:</i> | | | |
| Examen en fresco (100x) | Células epiteliales escamosas | > 1% | < 1% |
| | Leucocitos | Cuantitativo | |
| | Macrófagos alveolares | Cualitativo | |
| Coloración de Gram: Cualitativa / cuantitativa | Microorganismos | 1.No bacterias 2. Flora predominante 3. Flora polimicrobiana | |
| Col. Gram y/o Giemsa | Microorganismos intracelulares/extracelulares (se observan o no se observan) | | |
| Col. Ziehl Neelsen | Ídem esputo | | |
| <i>Recuento de colonias:UFC/ml.</i> | | | |
| | Negativo | 1. Negativo 2. No se observa desarrollo 3. Flora polimicrobiana | |
| Resultado: | Positivo | 1. Monomicrobiano. Género y especie del patógeno potencial 2. Polimicrobiano. Cada género y especie con su Rto. | |
| <i>Pruebas de sensibilidad</i> | | | |

Para los pacientes que no expectoran por tos ni en forma espontánea, otra muestra válida es la aspiración del contenido gástrico. El mejor momento para su obtención es en las primeras horas de la mañana, antes del desayuno.

Como el objetivo del lavaje gástrico es obtener el esputo deglutido durante la noche, la muestra debe obtenerse por lo menos 8 horas después de que el paciente haya comido o ingerido medicación.

Si el procesamiento del lavado gástrico debe demorarse algunas horas, el frasco de recolección debe contener alguna sal buffer alcalina.

Si la llegada al laboratorio es rápida y se procesa de inmediato, el buffer no es necesario ni deseable, porque interfiere en el tratamiento de descontaminación.

Microscopía

Todas las muestras clínicas, para el diagnóstico de una posible infección micobacteriana, deben examinarse en busca de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Esta característica hace que su microscopía tenga importancia fundamental.

El uso del método clásico de Ziehl-Neelsen determina esta propiedad: la retención del colorante después de su exposición a ácido-alcohol.

La microscopía ayuda fundamentalmente a:

- Cortar la cadena epidemiológica de contagio al detectar a los casos bacilíferos que son los que la mantienen.
- Detectar los nuevos casos de infección.

Al ser cuantitativa y seriada es útil para registrar el progreso de la enfermedad y puede ser utilizada como criterio para el seguimiento de la evolución, control y eficacia o no del tratamiento instituido.

Es conveniente tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- La buena selección de partes de muestras para preparar un frotis, ocasionalmente puede dar mejores resultados que el uso de concentrados.
- Muchas muestras que contienen bacilos tuberculosos probados por cultivo son negativas al examen en frotis debido a la baja sensibilidad del método, relacionada en parte al número de microorganismos presentes. Por ello, es fundamental por lo menos obtener tres muestras de esputo para baciloscopía.
- Es difícil distinguir los bacilos ácidosresistentes de los artificios de coloración, por lo que es necesario utilizar siempre portaobjetos nuevos para cada frotis.
- El portaobjeto se debe examinar siguiendo un esquema de guarda griega tal como se muestra en la figura 7, sin obviar los límites externos del preparado.

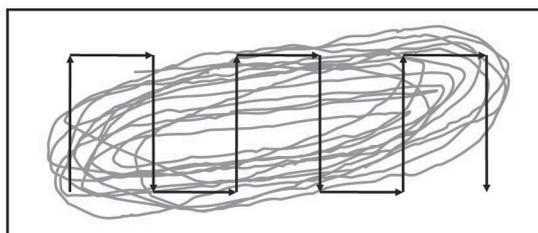


Figura 4: Método de observación microscópica.

La búsqueda se realiza con objetivo de inmersión y las micobacterias se observan como bacilos teñidos de rojo contra un fondo azul.

La observación debe ser cuantitativa (número de bacterias por campo microscópico) y se deben recorrer 200 campos para recién dar por negativos los frotis.

Informe de laboratorio para BAAR (Bacilo Ácido Alcohol Resistente):

- (-) Ningún BAAR en 200 campos microscópicos observados (1000X).
- (+) Menos de 1 BAAR por campo en 200 campos observados (1000X).
- (++) 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados (1000X).
- (+++) Más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados (1000X).
- (∞) Incontables BAAR por campo (1000X).

Procesamiento y cultivo

El mejor rendimiento de los cultivos se obtiene al descontaminar previamente las muestras de esputo.

El hidróxido de sodio, el digestivo más comúnmente usado, cumple la función de descontaminar las muestras y además licuar las secreciones, pero también es nocivo para los bacilos tuberculosos, por lo que el tiempo de descontaminación es fundamental, ya que a los 60 minutos mueren el 80% de los BAAR presentes en la muestra.

Las muestras obtenidas asépticamente como las quirúrgicas, líquido cefalorraquídeo, sinovial u otros líquidos internos del organismo, usualmente no requieren descontaminación.

El esputo o los tejidos de autopsia, sí la requieren.

Procedimiento de descontaminación, homogenización y concentración

1. Agregar al esputo NaOH (al 4% estéril) v/v.
2. Incubar a 35°C durante 20 minutos con agitación cada 10 minutos.
3. Centrifugar a 2000 rpm/min durante 20 minutos.
4. Neutralizar el sedimento con HCl (1 N estéril), previo agregado de rojo fenol (pH 6,8 a 7,4). Tener cuidado con este paso, la neutralización se ha completado a la primera gota de HCl que produce un viraje a amarillo del indicador.

Siembra

Medio sólido recomendado: Lowenstein-Jensen. Este medio contiene básicamente: huevos enteros frescos, sales definidas, glicerol, harina de papas y verde de malaquita como agente bacteriostático.

Sembrar en cinco tubos con medio en plano inclinado y tapón de algodón, 0,15 ml del sedimento obtenido en el proceso de descontaminación. Incubar en estufa a 35°C. A las 48 a 72 horas., cuando desaparece el líquido, agregar tapones de goma a los tapones de algodón, previo quemado e insertado de los mismos dentro del tubo (con pinza). Continuar la incubación.

El agregado de tapones de goma o caucho, se realiza para evitar la deshidratación del medio de cultivo, por el largo tiempo que se incubarán a 35°C.

Se realizan controles semanales hasta observar desarrollo.

En caso de que este no se produzca, incubar por lo menos 60 días antes de considerarlos negativos.

Para la identificación de los aislamientos y los estudios de sensibilidad correspondientes, enviar las cepas a Centros de Referencia.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison-Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison 2002-2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330homepage>
- Boldoneo, N. (Ed). Infecciones Agudas de las Vías Respiratorias Superiores. Diagnóstico y Terapéutica. Lund Internacional Publicaciones S.A.C. Vol. II-Nº 8. 1997.
- Calmaggi, A.; Clara, L.; González Arzac, M.; López Furst, M. J.; Levy Hara, G. Guía para el diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos. *Infect & Microbiol Clin* 12(2):6-30. 2001.
- Isenberg, H. D. (Ed.). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM press, Whashington D.C. 1998.
- Jacob, E.; Quinodoz, D.; Perotto, P.; Seijas Cacase, R.; Álvarez, C.; Sadino Vallvé, G.; Bonet, H.; Sinusitis. Sus complicaciones. *REQAL II* (6):152-159. 2004.
- Kubica, G. P.; Kent, P. T. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. U.S. Department of Health and Human Services. C.D.C., Atlanta, Georgia. 1985.
- Lopardo, H.; Hernández, C.; Morales, G. Infecciones de las Vías Aéreas Superiores. Módulo 10. Curso de Microbiología Clínica. AAM, CoBER, UNL.
- Lopardo, H.; Hernández, C.; Soloaga, R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bacterianas. *Apuntes de Laboratorio*. Laboratorios Britania. 1999.
- López, E.; Ceccoli, C. Faringitis Aguda. *Reseña de Infectología & vacunas*. 11(1). 2001.
- Sociedad Argentina de Pediatría, Comité Nacional de Neumonología, Comité Nacional de Infectología. Consenso: Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. *Arch.argent.pediatr* 100(2): 159-177. 2002.
- Soloaga, R.; Ellis, A.; Fernández, A. Procesamiento bacteriológico y micológico de muestras de vías respiratorias superiores: otitis media (OMA) y sinusitis. *Infect & Microbiol Clin* 11(1):10-24. 1999.
- Soloaga, R.; Ellis, A.; Fernández, A. Procesamiento bacteriológico y micológico de muestras de vías respiratorias superiores: faringitis y epiglottitis. *Infect & Microbiol Clin* 12(1):9-17. 2000.
- Soloaga, R.; Fernández, A.; Restelli, V.; Ángel, C.; Osses, J.; Cáneva, J.; Mazzei, J.; Tokumoto, M.; Gutfraind, Z. Diagnóstico bacteriológico de neumonía intrahospitalaria. *Infect & Microbiol Clin* 11(4):10-26. 1999.
- Soloaga, R.; Fernández, A.; Restelli, V.; Ángel, C.; Tokumoto, M. Neumonía nosocomial: diagnóstico bacteriológico. *Infect & Microbiol Clin* 7(6):144-161. 1995.
- Soloaga, R.; Procopio, A.; Fernández, A.; Squassi, V.; Tokumoto, M. Utilidad de los cultivos cuantitativos en bacteriología clínica. *Infect & Microbiol Clin* 11(2):12-32. 1999.
- Todar's Online Textbook of Bacteriology. [http:// www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)

GUÍA N° 4

Las Infecciones de Piel - Partes Blandas y Hueso

INFECCIONES NO NECROTIZANTES

Impétigo- ectima - erisipela - celulitis- foliculitis- forúnculo abscesos- úlceras-

Impétigo: los microorganismos más frecuentemente involucrados son:

- *Streptococcus* grupo A, típicamente después de una lesión leve.
- *Staphylococcus aureus* previa colonización nasal. En el 10% de los casos se puede presentar como impétigo bulloso con formación de ampollas con líquido amarillo claro que al romperse dejan una superficie húmeda.
- *Streptococcus* grupo B, menos frecuente.

Ectima: los microorganismos involucrados son *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*.

Erisipela: el agente frecuente es: *Streptococcus pyogenes*, menos frecuentes: *Streptococcus* grupo G, C y B; y ***Staphylococcus aureus***.

Celulitis: agentes etiológicos frecuentes: *Streptococcus pyogenes* típicamente después de una lesión leve, *Staphylococcus aureus* asociado con trauma penetrante o heridas. Menos frecuentes: *Streptococcus* grupo G, C y B; *Haemophilus influenzae*, bacilos gramnegativos (enterobacterias, *Aeromonas*, *Vibrio*) y anaerobios. En celulitis posteriores a arañazos de gatos el agente etiológico más frecuente es *Pasterurella multocida*.

El diagnóstico de laboratorio microbiológico está especialmente indicado en pacientes inmunocomprometidos, falla terapéutica y en el caso de sospechas de agentes etiológicos distintos a los predecibles.

Recordar que los microorganismos asociados a celulitis, aunque presentes, se encuentran usualmente en relativamente bajas concentraciones.

Foliculitis: agentes involucrados más frecuentemente: micóticos y bacterianos. De estos últimos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterias como *Proteus* spp.

El diagnóstico de laboratorio está especialmente indicado en pacientes inmunocomprometidos y ante fallas de tratamiento y recurrencias.

Forúnculo: el agente etiológico es el *Staphylococcus aureus* (ídem para **carbuncho**).

Actualmente ante la aparición de SAMR-Co (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de la comunidad) es necesario el diagnóstico de laboratorio.

Abscesos cutáneos: el agente más frecuente es *Staphylococcus aureus*, menos frecuente es la participación de anaerobios como *Propionibacterium acnes* o *Peptostreptococcus* spp, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* o *Actinomyces*, según sea la localización de la lesión.

En usuarios de drogas inyectables, como heroína, se han descrito infecciones por *Clostridium botulinum*, en especial en mujeres por la mayor tendencia a inyectarse en los tejidos blandos antes que en las venas.

En estos casos la muestra más útil es el suero donde en el 93% de los casos puede detectarse la presencia de toxina botulínica.

El cultivo anaeróbico de las muestras obtenidas por punción aspiración (PAS) tiene menor sensibilidad (aproximadamente 63%).

También en estos pacientes (usuarios de drogas) son más frecuentemente recuperados anaerobios de la flora oral.

Se ha sugerido que la presencia de bacterias orofaríngeas podría ser causada por la práctica de lubricar las agujas con saliva o de humedecer con saliva el algodón utilizado previo a la inyección, entre otras.

Úlceras cutáneas: *Staphylococcus aureus* y bacilos gramnegativos son los agentes etiológicos de hallazgo común en las úlceras por insuficiencia venosa.

Flora polimicrobiana con predominio de enterobacterias y anaerobios, fundamentalmente *Bacteroides* spp se encuentra con mayor frecuencia en las úlceras de decúbito, frecuentes en hospitalizados.

Recordar que cuando se aíslan microorganismos constituyentes de la flora habitual de piel y mucosas, como estafilococos coagulasa negativa y *Corynebacterium* spp, se recomienda informar “flora habitual de piel”.

Recordar que cuando se recuperan microorganismos considerados oportunistas, se recomienda el diálogo con el médico tratante, a fin de investigar la forma de la toma de muestra y datos de la clínica del paciente.

Recordar que las muestras obtenidas por PAS deben ser transportadas y conservadas a temperatura ambiente.

La jeringa no debe contener aire y la aguja debe ser obturada con tapón de goma, en especial ante la probabilidad de infecciones anaeróbicas.

INFECCIONES NECROTIZANTES

Gangrena sinérgica progresiva: *Staphylococcus aureus* y Estreptococos no hemolíticos microaerofílicos, son los agentes principales. También son identificados en menor cuantía *Proteus* spp, bacilos gramnegativos.

Mycobacterium kansasii, *M. chelonae* y *M. smegmatis* se encuentran involucrados en inmunodeprimidos tratados con esteroides.

| Infecciones no necrotizantes | Impétigo | Impétigo bulloso Ectima | Celulitis Erisipela | Foliculitis | Forúnculos Abscesos cutáneos | Ulceras cutáneas |
|------------------------------|---|--|--|---|---|--|
| Toma de muestra | Limpiar la zona con povidona yodo, levantar las costras superficiales y raspar o hisopar la base de la lesión. | Aspirar con jeringa. Levantando las costras superficiales. Se puede inyectar pequeño volumen de solución fisiológica. | P.A.S. (punción aspiración) del borde de la lesión. Obturar la aguja. En celulitis acompañar de hemocultivos. | P.A.S o hisopos de lesiones abiertas, En caso de escaso material inyectar solución fisiológica estéril y aspirar | P.A.S, siendo útil la toma de hemocultivos en casos de carbunco. | P.A.S. de la zona que rodea la escara, o del material profundo accediendo por debajo del tejido necrótico. No utilizar hisopos |
| Procesamiento | Es de utilidad el examen microscópico previa coloración de Gram. La siembra en agar sangre es suficiente para estos materiales. En caso de pacientes que reciben antibióticos agregar un medio líquido (infusión cerebro corazón suplementado, caldo tioglicolato). | Seguir las indicaciones para impétigo. Agregar cuando se sospecha celulitis agar chocolate para la recuperación de <i>Haemophilus spp</i> , y cultivos anaeróbicos | Seguir las indicaciones para impétigo. Agregar cuando se sospecha celulitis agar chocolate para la recuperación de <i>Haemophilus spp</i> , y cultivos anaeróbicos | El examen directo es de importancia aquí, en especial para la búsqueda de agentes microscópicos. Sembrar en: agar sangre- agar chocolate- caldo infusión cerebro corazón suplementado o tioglicolato. | En forúnculos la siembra en agar sangre es suficiente. En abscesos cutáneos es importante la coloración de Gram Sembrar en agar sangre, un medio lactosado si se sospechan bacilos Gram negativos y medios para anaerobios. | Deben tomarse cultivos para aerobios y anaerobios con los recaudos ya señalados antes. |

Los medios sólidos incubar en aerobiosis o con CO₂ según corresponda hasta 72 hs a 35°C y los medios líquidos hasta 5 a 7 días a 35°C, realizando coloraciones de Gram, extrayendo una alícuota del fondo del tubo ante la presencia de turbidez y posterior subcultivos en medios sólidos para aislamiento. Realizar lecturas diarias para ambos tipos de medios.

Celulitis clostridial: *Clostridium perfringens* es el agente etiológico, con menor frecuencia puede estar involucrado *Clostridium septicum* y otros clostridium, así como flora anaeróbica facultativa.

Recordar que la observación de esporos es rara en *C. perfringens*, y que estos microorganismos pueden perder su coloración por lo que es importante detenerse en la observación de su morfología, de bacilos grampositivos gruesos con extremos rectos.

Recordar hacer constar en el informe de un examen directo la presencia de flora compatible con flora anaeróbica si se la observa.

Recordar que las siembras anaeróbicas deben ir acompañadas de siembras aeróbicas incubadas en atmósfera de CO₂ para cubrir otros microorganismos probables

Celulitis no clostridial anaeróbica: anaerobios no esporulados, grampositivos y gramnegativos son los agentes etiológicos -no *Clostridium*- participando o no en flora mixta junto a *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, enterobacterias, *Aeromonas* spp. y otras. *Peptostreptococcus* spp, *Bacteroides* spp, se encuentran entre los anaerobios más identificados.

Recordar la importancia aquí de que la muestra sea transportada al laboratorio en condiciones anaeróbicas.

Recordar que la coloración de Gram tiene gran importancia en estas patologías.

Mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa): *Clostridium perfringens* es el principal agente etiológico, siguiendo *C. septicum* y *C. novyi*.

Recordar informar: bacilos grampositivos compatibles con *Clostridium* spp.

Tomar todos los recaudos vistos en las patologías anteriores.

Fascitis necrotizante: *Escherichia coli*, *Proteus* spp y otras enterobacterias, *Bacteroides* spp, *Peptostreptococcus* spp, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, son los microorganismos más asociados a la fascitis necrotizante polimicrobiana o llamada también tipo I, además de muchos otros.

Streptococcus pyogenes y *Staphylococcus aureus* son los responsables de la etiología de la fascitis necrotizante monomicrobiana o llamada tipo II.

Recordar que *S. pyogenes* y *Bacillus cereus* son otros agentes de la fascitis necrotizante, con clínica semejante a la clostridial.

Recordar que el examen directo tiene gran importancia en ambos tipos: en la polimicrobiana por no ser la etiología predecible y la probable participación de anaerobios, y en la monomicrobiana por la característica morfológica y tintorial típica de *Streptococcus pyogenes* (que se presentan en gran cantidad) o *Staphylococcus aureus*.

Recordar la urgencia de diagnóstico que requiere esta patología, por lo que un examen directo aún de material aspirado de las ampollas de piel que aparecen o de una pequeña biopsia de la zona afectada, antes del debridamiento, es un gran aporte para la conducta a seguir.

Infecciones del pie diabético: Es el *Staphylococcus aureus* el agente etiológico principal de las infecciones leves, aquellas que no comprometen el miembro, por ser superficiales, sin compromiso óseo ni articular y no estar acompañadas de toxicidad sistémica.

Bacilos gramnegativos y estreptococo y flora anaeróbica suele encontrarse raramente.

Diferentes microorganismos, aerobios y anaerobios: *S. aureus*, *Streptococcus* grupo B, *Bacteroides* spp y a veces *Clostridium* spp, se involucran en las *infecciones graves*, las que comprometen el miembro por afectar severamente hueso, articulaciones y compromiso general con marcada toxemia, infecciones estas que pueden poner en riesgo la vida del paciente.

La recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., ocurre en muestras superficiales de úlcera y no en tejidos profundos en pacientes internados, por lo que se asume como contaminación.

| Infecciones necrotizantes | Gangrena sinérgica progresiva | Celulitis clostridial | Celulitis no clostridial anaeróbica | Mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa) | Fascitis necrotizante | Infecciones del pie diabético |
|---------------------------|---|--|--|--|--|--|
| Toma de muestra | P.A.S. y biopsia de las úlceras | Punción del centro de la lesión y tejido subcutáneo que se obtiene en quirófano durante el desbridamiento. | Por punción o biopsia de tejido muscular. Acompañar de hemocultivos. | Por punción o biopsia de tejido muscular. Acompañar de hemocultivos. | En ambos tipos de fascitis se obtienen en quirófano, por punción del centro de la lesión o bien tomando trozos de tejidos necrosados. Acompañar de hemocultivos. | Muestra ideal: biopsia de tejido necrótico profundo, o toma a través de la úlcera, obtenida en quirófano. Evitar contaminación con flora de piel y la aspiración de tejidos profundos por su baja recuperación de agentes etiológicos. |
| Procesamiento | Es importante la coloración de Gram. Agregar coloración de Ziehl-Neelsen. | La observación de esporos de <i>C. perfringens</i> es rara, buscar bacilos Gram positivos gruesos con extremos rectos y presencia de flora anaeróbica. | Ausencia de leucocitos y gran cantidad de bacilos Gram positivos con las características de <i>C. perfringens</i> , sin esporos, es el hallazgo frecuente. | El examen directo tiene gran importancia en ambos tipos de fascitis | Es importante la coloración de Gram. | |

Sembrar en medios sólidos y líquidos para microorganismos aerobios: agar sangre, un medio lactosado para bacilos Gram negativos y medios para anaerobios.

Los medios sólidos incubar en aerobiosis o con CO₂ según corresponda hasta 72 hs a 35°C y los medios líquidos hasta 5 a 7 días a 35°C, realizando coloraciones de Gram, extrayendo una alícuota del fondo del tubo ante la presencia de turbidez y posterior subcultivos en medios sólidos para aislamiento. Realizar lecturas diarias para ambos tipos de medios.

● ARTRITIS INFECCIOSA

Los agentes etiológicos (bacterianos son los principales) varían con la edad de los pacientes.

Staphylococcus aureus es el agente etiológico principal de la artritis séptica del adulto, como *H. influenzae* es el agente predominante en niños y *N. gonorrhoeae* en adultos jóvenes.

Otros microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*, *Neumococo*, *Streptococcus* grupo B, C y G, *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios, *Mycobacterium tuberculosis*, espiroquetas y *Clostridium* spp pueden estar involucrados, dependiendo su participación del estado inmune del paciente, asociaciones malignas y edad.

En general en un 10-20% de las artritis bacterianas diagnosticadas clínicamente no se aísla el agente etiológico.

Toma de muestra

Líquido articular obtenido por aspiración en tubo estéril **sin anticoagulante** y con los recaudos ya mencionados en el transporte para muestras con probable participación de anaerobios y aerobios (aguja obturada y a temperatura ambiente).

Procesamiento de laboratorio

Centrifugar una porción del líquido y con el sedimento proceder a examen en fresco (observar hematíes, respuesta inflamatoria y eventualmente cristales), coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen, y Giemsa.

Es conveniente conservar una porción de la muestra por si es necesario resembrar el material original.

La coloración de Gram tiene baja sensibilidad, pudiendo no observarse la presencia de microorganismos.

La sensibilidad de la coloración de Gram es diferente según se trate de artritis gonocócica y no gonocócica.

Evaluar la respuesta inflamatoria es de suma importancia.

| | Análisis fluido articular | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Normal | Inflamación | Infección bacteriana |
| Color | Incoloro amarillo pálido | amarillo | amarillo a verde |
| Aspecto | Transparente | Opaco /turbio | opaco /purulento |
| Leucocitos /mm ³ | <200 | 5000-75000 | >100000 |
| Polimorfonucleares (PMN) | <25% | >50% | >75% |
| Glucosa | ≈ glucosa sanguínea | < que glucosa sanguínea | < que glucosa sanguínea |
| Gram | Negativo | negativo | positivo (50-75%)* |
| Cultivo | Negativo | negativo | frecuentemente positivo* |

*Excepto en artritis gonocócica donde el Gram y el cultivo son positivos en menos del 50% de los casos.

- **ARTRITIS SÉPTICA: EXAMEN LÍQUIDO SINOVIAL**

Toma de muestra

Líquido articular obtenido por aspiración en tubo estéril sin anticoagulante.

Procesamiento

En la coloración de Gram tener en cuenta los falsos positivos por mucina precipitada. Es conveniente centrifugar el líquido previamente ya que mejora el rendimiento. El recuento de leucocitos generalmente es elevado con >90% de predominio de PMN, valores que también se pueden presentar en otras patologías: artritis cristalica, artritis reumatoidea, síndrome de Reiter, entre otras.

Sembrar rápidamente. Las siembras están dirigidas a la búsqueda de los patógenos involucrados: agar sangre, agar chocolate, agar lactosado, caldo tioglicolato, con y sin CO₂, agregando Thayer-Martin ante la sospecha de artritis gonocócica y medios de cultivo anaeróbico. Incubar a 35°C al menos 72 horas.

En todos los casos donde se usen medios líquidos (tioglicolato) incubar al menos 7 días, pues los cultivos primarios en placa frecuentemente son negativos.

Acompañar de hemocultivos.

Consideraciones

El rendimiento de la coloración de Gram es, aproximadamente, del 50-75% para cocos grampositivos, 50% para bacilos gramnegativos y menor al 25% para gonococos.

En artritis séptica no gonocócica más del 90% de los cultivos son positivos. Dicho porcentaje disminuye al 25-30% en artritis gonocócica.

Los microorganismos recuperados solo en los medios líquidos deben ser interpretados con PRECAUCIÓN.

Si se recuperan microorganismos que forman parte de la flora habitual de piel y mucosas o que pueden ser considerados oportunistas, se debe dialogar con el médico para conocer detalles de la toma de muestra y de la patología del paciente.

La detección de antígenos por aglutinación con partículas de látex o contraimmunoelectroforesis no es muy útil, salvo para la búsqueda de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*.

Recordar que el diagnóstico definitivo de artritis tuberculosa se realiza identificando los bacilos ácido alcohol resistentes (b.a.a.r.) por coloración de Ziehl-Neelsen en biopsia de tejido sinovial o aislando *M. tuberculosis* en cultivo del tejido sinovial o del fluido articular, siendo estos positivos en más del 80% de los casos.

Recordar que para el diagnóstico de Enfermedad de Lyme, producida por *Borrelia burgdorferi*, el diagnóstico se realiza por aislamiento de las espiroquetas a partir de hemocultivos o demostrando su presencia en biopsia de piel y membrana sinovial a través de coloraciones histológicas.

- **INFECCIONES OSTEO-ARTICULARES ASOCIADAS A PRÓTESIS**

Siempre trabajar todas las muestras que llegan al laboratorio (tejidos, hueso, líquido articular).

Disponer del material necesario para disgregar o romper las muestras sólidas (tijera, mortero, bisturí, vortex).

Al trabajar con tejidos nunca secar al mechero el portaobjeto que será sometido a coloración.

Si el material no es suficiente agregar medio de cultivo líquido al frasco.

Para investigar infecciones osteoarticulares protésicas no es conveniente estudiar: heridas superficiales, trayecto sinusal, hisopos.

Es conveniente discontinuar el tratamiento antibiótico por lo menos 2 semanas antes de la toma de muestra.

El líquido articular obtenido de infecciones protésicas se procesa de la siguiente manera:

Toma de muestra

Líquido articular obtenido por aspiración en tubo estéril con heparina y con los recaudos ya mencionados en el transporte para muestras con probable participación de anaerobios y aerobios (aguja obturada y a temperatura ambiente).

Procesamiento de laboratorio

Solicitar el envío de la mayor cantidad de muestra posible, ya que la mayor parte del líquido articular se debe sembrar en medios líquidos (tioglicolato) y frascos de hemocultivo.

De contar con más de 10 ml de muestra, inocular 10 ml en frasco de hemocultivo adulto, de contar con menos de 10 ml utilizar frascos de hemocultivo pediátrico.

Centrifugar una porción del líquido y con el sedimento proceder a examen en fresco, coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen, y Giemsa.

La coloración de Gram tiene baja sensibilidad.

Es de suma importancia evaluar la respuesta inflamatoria.

El líquido articular se debe acompañar siempre de hemocultivos.

Las siembras están dirigidas a la búsqueda de los patógenos involucrados: agar sangre, agar chocolate, agar lactosado, caldo tioglicolato, con y sin CO₂ y medios de cultivo anaeróbico. Incubar a 35°C al menos 72 horas.

En todos los casos donde se usen medios líquidos (tioglicolato, frascos de hemocultivo) incubar al menos 7 días, pues los cultivos primarios en placa frecuentemente son negativos.

Ante cultivos negativos e histología o citoquímica sospechosa de infección bacteriana averiguar: ¿son las mismas muestras?, ¿del mismo sitio?

● INFECCIONES DEL HUESO: OSTEOMIELITIS

En las osteomielitis los microorganismos patógenos pueden diseminarse al hueso por una de tres rutas: diseminación hematógena, extensión directa a partir de un sitio contiguo de infección o por inoculación directa.

Los agentes etiológicos varían según grupo etario, la epidemiología y el tipo de ruta de la infección.

Osteomielitis hematógena (piogénica)

La forma aguda ocurre predominantemente en niños y en menores de 21 años.

La osteomielitis hematógena en niños en un 60-90% de los casos es causada por *Staphylococcus aureus*.

En neonatos además se deben considerar como agentes etiológicos a *Streptococcus* del grupo B y *Escherichia coli*.

En adultos y en gerontes *Staphylococcus aureus* (55% de los casos), los bacilos gramnegativos y *Streptococcus* spp. son los más involucrados.

P. aeruginosa se asocia a adictos intravenosos y pacientes portadores de sonda vesical.

Bacteroides fragilis se asocia a diabetes, mordeduras humanas.

Las muestras de hemocultivos y la recuperación del agente etiológico del hueso son mandatorios para el diagnóstico adecuado.

En niños, los hemocultivos son positivos en más del 50% de los casos.

Toma de muestra

Biopsia ósea, agregando, de ser factible, biopsia del tejido adyacente y punción de material purulento.

Recordar que no se recomienda las muestras obtenidas por hisopado del material de fistula dado la falta de correlación con los microorganismos de hueso.

Recordar que se recomienda discontinuar el tratamiento con antibióticos al menos 2 semanas antes de la toma de muestra.

Procesamiento de laboratorio

Se debe trabajar con todas las muestras que lleguen.

Como es necesario disgregar o romper tejidos se debe disponer de: tijera, mortero y bistrú, todos ellos estériles, vortex.

Se puede utilizar también arena estéril tamizada.

Para el examen directo disponer siempre de portaobjetos nuevos y nunca secarlos con tejido en mechero.

Para las siembras, seguir lo mencionado en infecciones articulares, sembrando siempre en placa entera evitando tocar los bordes.

Si el material es escaso agregar medio de cultivo líquido al frasco.

Luego de la siembra, el frasco con tejido y caldo también se incuba.

Recordar que

- En las infecciones articulares y óseas asociadas a prótesis, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* son los microorganismos más involucrados.
- La participación de estreptococo grupo viridans, *Peptostreptococcus* spp y *Streptococcus* A, B, C y G se asocia con instrumentaciones odontológicas, así como bacilos gramnegativos a infecciones y a instrumentaciones del tracto gastrointestinal
- Las muestras: obtenidas en quirófano: líquido articular, hueso, cemento, tejidos periarticulares (muestras de varios sitios) son recomendadas para aumentar la recuperación de patógenos.
- Para el procesamiento de laboratorio seguir las indicaciones dadas en éstas infecciones no asociadas a prótesis.
- En la osteomielitis tuberculosa el diagnóstico definitivo se realiza demostrando microscópicamente la presencia de b.a.a.r. en las lesiones o en cultivo del hueso, articulación o líquido articular.

Recordar que:

Deben realizarse pruebas de sensibilidad de los hallazgos, siempre que éstas sean factibles.

Recordar que en la búsqueda de anaerobios es importante tener en cuenta:

- Olor desagradable debido a los productos metabólicos finales producidos por bacterias aerobias.

- Fluorescencia roja observada bajo luz UV, producido por *Porphyromonas* spp o *Prevotella* spp pigmentadas.
- Tejido necrótico - purulento- sanguinolento.
- Gránulos de azufre en casos asociados a *Actinomyces* spp.
- Aspecto del material.
- Usar jarra de anaerobios o sistemas alternativos para la incubación de los cultivos.
- Usar medios no selectivos suplementados adecuados para permitir el desarrollo de anaerobios exigentes.
- Medios con antibióticos para permitir el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos.
- Un medio líquido suplementado.
- Medios para recuperación de aerobios.
- Examinar las placas cada 48 hs si no se dispone de sistemas especiales para manipular las placas sin contacto de O₂ cuidar la exposición al O₂ y reponer la atmósfera reducida inmediatamente.
- *Clostridium* y *Bacteroides* del grupo *fragilis* pueden desarrollar a las 24 hs, lo que ante su sospecha, se recomienda una apertura de placas a las 24 hs.
- Mantener la incubación anaeróbica hasta 7 días.
- El desarrollo de medios líquidos se estudia por coloración de Gram y subcultivos en medios sólidos selectivos y no selectivos en anaerobiosis y aerobiosis.
- Los anaerobios se presentan frecuentemente en cultivos mixtos con otros anaerobios y con aerobios o facultativas.
- Observar colonias con lupa.
- Todo subcultivo de anaerobios, se realiza en aerobiosis y en CO₂.
- Algunas sospechas: - colonias de bacilos grampositivos con “spreading” de *Clostridium septicum* o *tetani*. - colonias de bacilos gramnegativos pigmentadas de *Porphyromonas* spp o *Prevotella* spp - doble zona de hemólisis de *C. perfringens*.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Asociación Argentina de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Entre Ríos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Infecciones de piel y partes blandas y osteoarticulares. Imprenta Macagno SRL. Santa Fe.
- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison-Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison 2002-2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330homepage>.
- Benítez, C. Piomiositis Tropical. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. XXI(2): 28-31. 2003.
- Cottam, J.; Shenefelt, P.; Sinnott, J.; Stevens, G. L.; Cancio, M.; Sakalosky, P. E. Common skin infections in the elderly. *Infect Med* 16(4):287-290. 1999.
- Domínguez Luzón, M. A.; Rojo, M. Cambios en la Epidemiología de *Staphylococcus aureus* Resistentes a la meticilina. Recomendaciones para el control de su diseminación. Control Calidad SEIMC. http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Marsactrl.htm.
- Ellis, M. W.; Hospenthal, D. R.; Dooley, D. P., Gray, P. J.; Murray, C. K. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis* 39(7):971-9. 2004.
- Gabillot-Carré, M.; Roujeau, J. C. Acute bacterial skin infections and cellulitis. *Curr Opin Infect Dis* 20(2):118-123.2007.
- Gobernado, M.; López-Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(Supl. 2): 54-60. 2003.
- Goldenberg, D. L.; Reed, J. I. Bacterial Arthritis. *N Engl J Med* 312(12):764-771. 1985.
- Guerrero, A.; Ariza, J.; Gomis, M.; Barberán, J.; Sánchez, C.; Barros, C. Infecciones osteoarticulares y de partes blandas. <http://www.seimc.org/protocolos/clinicos/prot6.htm>.
- Isenberg, H. D. (Ed.). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM press, Whashington D.C. 1998.
- Kaandorp, C. J.; Van Schaardenburg, D.; Krijnen, P.; Habbema, J. D.; van de Laar, M. A. Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 38(12):1819-25. 1995.
- Lasala, B.; López, H. (Eds). *Infectología*. XI Biblioteca de Medicina. Buenos Aires, El Ateneo. 1994.
- Molinari, G.; Chhatwal, G. S. Streptococcal invasion. *Curr Opin Microbiol* 2(1):56-61.1999.
- Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Edición. American Society for Microbiology, ASM Press. 1999.
- Pannaraj, P. S.; Hulten, K. G.; Gonzalez, B. E.; Mason, E. O. Jr.; Kaplan, S. L. Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 43(8):953-960. 2006.
- Quiroga, M.; Pegels, E.; Villalba, V.; Stefañuk, R.; Vergara, M. *Aeromonas* spp. involucradas en infecciones de piel, partes blandas y hueso. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología- X Congreso Argentino de Microbiología. A101 (en CD), Buenos Aires, Argentina. 2004.

- Quiroga, M.; Stefañuk, R.; Krakowiesky, C.; Villalba, V.; Pegels, E.; Vergara, M. Infecciones por *Aeromonas* spp. en adultos, excluyendo las infecciones entéricas. II Jornadas de Investigación Científico Tecnológicas de la UNaM y IV Jornadas de Investigación Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. S/N, pág. 202, Posadas, Misiones, Argentina. 2003.
- Recarte García; Andrade, C.; García Alonso, R.; Avilés Izquierdo, J. A.; Pardo Guimerá, V. Artritis de origen infeccioso. JANO 65(1485):30-35. 2003.
- Tart, A. H.; Walker, M. J.; Musser, J. M. New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. Trends Microbiol 15(7):318-325. 2007.
- Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net>
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Pegels, E.; Husulak, E.; Oviedo, P.; Villalba, V.; Miranda, A. M. Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. 2001
- Vergara, M.; Rinaldi, M.; Quiroga, M. *Streptococcus* β -hemolítico grupo A y grupo B aislados en infecciones graves de pacientes adultos. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología- X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 2004.

GUÍA N° 5

Las Infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC)-meningitis

El diagnóstico de meningitis puede hacerse mediante el aislamiento de los organismos de la sangre o del LCR.

El estudio del Líquido cefalorraquídeo (LCR):

A) FLORA NORMAL: ninguna

B) PATÓGENOS:

1- MENINGES:

- *Haemophilus influenzae* (niños de 6 meses a 4 años)
- *Streptococcus pneumoniae* (neumococo)
- *Neisseria meningitidis* (meningococo)
- *Escherichia coli*, otros bacilos entéricos gramnegativos y
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Staphylococcus aureus* (en la mayoría de los casos como consecuencia de una cirugía o rotura de un foco parameningeo)
- *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Streptococcus* (grupos B o D en neonatos)
- *Listeria monocytogenes*
- *Leptospira* spp.
- *Treponema pallidum*

2- ABSCESOS CEREBRALES Y OTROS FOCOS PARAMENINGEOS:

- *Streptococcus* spp.
- *Peptostreptococcus* spp.
- *Bacteroides* spp
- *Staphylococcus aureus*
- *Propionibacterium* (difteroides anaeróbicos)
- Bacilos entéricos gramnegativos
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Listeria monocytogenes*

C) AGENTES ETIOLÓGICOS PROBABLES SEGÚN EDAD:

1- NEONATOS

- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae* (del Grupo B)
- *Klebsiella pneumoniae*
- Otros gramnegativos: enterobacterias, *Pseudomonas* spp, *Flavobacterium* spp, *Acinetobacter baumannii*.
- *Listeria monocytogenes*

2- LACTANTES

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae* tipo "b"
- *Neisseria meningitidis*

3- ADULTOS

Traumáticas:

- *Staphylococcus aureus* (infección inmediata)
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli* (ambos, en infecciones de más de tres días)

No traumáticas:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*

● COMENTARIOS

A pesar de que el cuadro clínico y la epidemiología puedan brindar datos que acerquen un diagnóstico correcto, son insuficientes, por lo cual debe recurrirse a la punción lumbar.

En todos los pacientes bajo sospecha de meningitis debe hacerse un estudio completo de LCR, no solamente químico y citológico, sino bacteriológico.

La rápida identificación del agente etiológico es de fundamental importancia para establecer un diagnóstico y tratamiento correctos, que van a incidir en el curso y secuelas de esta patología.

● OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La toma de muestra de LCR es una técnica invasiva y debe hacerla personal con experiencia en condiciones asépticas.

Si se sospecha la presencia de meningitis, **el LCR es la mejor muestra clínica para hacer el aislamiento e identificación de los agentes etiológicos.**

Junto a la toma de LCR debe realizarse la toma de hemocultivos a fin de aumentar la probabilidad de hallazgo bacteriológico, puesto que la mayoría de las bacterias llegan a meninges por vía sanguínea.

Las muestras clínicas deben obtenerse antes de haber iniciado la terapia antimicrobiana, para evitar la pérdida de la viabilidad de los agentes etiológicos.

La muestra de LCR se recoge en dos tubos estériles, que se envían al laboratorio, uno para estudio citoquímico y el otro para estudio bacteriológico.

Si solo se dispone de un tubo, debe enviarse para microbiología

Si hubiera más de uno, el segundo se envía a microbiología – si es posible acompañado de un portaobjeto donde se colocó una gota del LCR.

Con el fin de preservar la viabilidad de los gérmenes es recomendable colocar en un frasco de hemocultivo una porción del LCR obtenido.

La llegada al laboratorio de bacteriología debe ser inmediata puesto que el tiempo atenta contra la viabilidad de los patógenos delicados; cuidando que el transporte se haga manteniendo la muestra a 35 a 37°C.

● **PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

El material debe ser procesado inmediatamente. Si esto no fuera posible, mantener el espécimen en estufa a 35°C y sembrarlo lo antes posible.

Examen macroscópico

Observar y anotar las siguientes características: cantidad aproximada, aspecto, presencia de coágulos, color, presencia de sangre, red de fibrina.

Examen microscópico:

Centrifugar el LCR en forma estéril a 1000 rpm. durante aproximadamente 10 minutos.

Separar el sobrenadante en forma estéril.

Tomar una ansada del sedimento y realizar un extendido sobre un portaobjetos nuevo, enjuagado con alcohol y seco.

Si el material es muy espeso, se puede diluir con una gota de solución fisiológica.

Dejar secar, fijar a la llama y colorear con coloración de Gram.

Observar detenidamente el frotis.

Los hallazgos de este examen directo se comunican inmediatamente al médico tratante.

Los organismos grampositivos como *Streptococcus pneumoniae* se detectan con mayor facilidad que *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*, puesto que estos pueden pasar inadvertidos entre el fondo y los núcleos rosados de los leucocitos.

Meningococo y *Haemophilus influenzae* son difíciles de detectar en las coloraciones directas, pues suelen estar enmascarados o aún confundirse con detritus celulares o restos de fibrina.

Tener presente los artificios de coloración porque es frecuente cometer los siguientes errores:

- a) Interpretación de una coloración de Gram precipitada (artificio de coloración) como cocos grampositivos.
- b) Cápsulas falsas por la técnica de coloración o por falta de foco al observar al microscopio puede confundir con *Streptococcus pneumoniae*.
- c) Interpretación errónea de *Haemophilus influenzae* con coloración bipolar, como *Streptococcus pneumoniae* decolorados en exceso.

Se deberán realizar además coloraciones con azul de metileno, preparados con tinta china, coloración ácido-alcohol resistente.

La presencia de diplococos gramnegativos, intra y extracelulares orienta el diagnóstico hacia *Neisseria meningitidis*, aunque es muy difícil diferenciar, por observación microscópica, este germen de *Mima* spp y *Moraxella* spp, de morfología similar, aunque exclusivamente extracelulares.

El hallazgo de bacilos cortos o cocobacilos, pequeños, tenues, pleomórficos, gramnegativos, hace pensar en *Haemophilus influenzae*, especialmente en niños.

Listeria monocytogenes (bacilo grampositivo semejante a difteroides), puede presentarse intra o extracelular, dispuesto en pares, forma de V o empalizadas.

El examen directo de un LCR debe ser realizado con detenimiento, método y experiencia.

No dar un informe definitivo hasta completar el estudio del cultivo, ya que los gérmenes pueden ser muy escasos o estar enmascarados.

Cultivos

Para la siembra del material se utilizarán medios de cultivo agarizados, caldos enriquecidos, y medios bifásicos.

El más rico de estos medios es el agar chocolate suplementado (con Britalex, Isovitalex, Vitox). Por su composición (agregado del complejo vitamínico y cofactores) actúa de enriquecimiento para los microorganismos de crecimiento dificultoso y a su vez permite el desarrollo de los gérmenes comunes, permitiendo la obtención de colonias más grandes y voluptuosas.

Cuando no se dispone de suplemento vitamínico, el agar chocolate es un medio rico que permite el desarrollo de *Haemophilus*, *Neisseria* y neumococo además de gérmenes comunes (enterobacterias, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* spp), igual que el anterior.

El agar sangre, al cual se le cruza una estría de estafilococo (productor de factor V), permite obtener desarrollo de *Haemophilus influenzae* alrededor de la estría (Satelitismo), además de estreptococos, neumococos, micrococos, estafilococos, bacilos entéricos, pudiendo además evaluarse los diferentes tipos de hemólisis.

La atmósfera con 3 a 10% de CO₂ esencial para el desarrollo de meningococo, es beneficiosa para muchos gérmenes. Esta atmósfera se logra colocando una vela encendida y un algodón humedecido en un recipiente hermético.

El medio de Loeffler nos servirá para obtener desarrollo de *Listeria* (a temperatura ambiente) en formas peritricas muy móviles.

Incubando a 37°C, permite el estudio del poder proteolítico de *Moraxella*.

El medio de Thayer-Martin para aislar *Neisseria meningitidis*, solo es utilizado para el estudio del germen desde sitios contaminados como pueden ser pacientes portadores nasofaríngeos u otras muestras (petequias).

En muestras de LCR, sangre o líquido pleural no es necesario agregar el suplemento inhibidor.

El medio bifásico de agar chocolate y caldo BHI con el agregado de 20% de sacarosa permite el desarrollo de bacterias con pared defectiva por tratamientos con antimicrobianos o formas L.

Los medios enriquecidos con el Suplemento N, son óptimos para la recuperación de meningococos y gonococos.

La cátedra recomienda la siembra en medio bifásico de los LCR turbios en los que no se observen gérmenes al Gram, y aquellos provenientes de pacientes tratados anteriormente con antibióticos.

Es importante recordar que:

- a) Existen meningitis bacterianas que en su fase inicial presentan líquidos claros (por ejemplo: meningitis fulminante).
- b) Que la hipoglucoorraquia no desciende exclusivamente por acción bacteriana, sino que en primer lugar la glucosa es utilizada por los PMN y que su valor debe ser relacionado con la glucemia.
- c) Que además de *Mycobacterium tuberculosis* hay bacterias, como *Listeria monocytogenes*, que producen aumento de células mononucleares.

| Medio de cultivo | Temp. incubación | Atmósfera | Desarrollo de: |
|--|------------------|-----------------|---|
| Agar Thayer- Martin | 35° C | CO ₂ | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| Agar chocolate | 35° C | CO ₂ | <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y gérmenes comunes |
| Agar chocolate con Suplemento Vitamínico (1%) | 35°C | CO ₂ | <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> y gérmenes comunes |
| Agar sangre + estría de <i>Staphylococcus</i> | 35°C | CO ₂ | <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> y gérmenes comunes |
| Agar lactosado | 35°C | Común | Bacilos entéricos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Medio bifásico: Agar chocolate + Caldo infusión cerebro-corazón (BHI) con 20% Sacarosa | 35°C | CO ₂ | <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> y gérmenes comunes, completos y/o con paredes defectuosas |
| Caldo Tioglicolato con Indicador | 35°C | Común | Gérmenes con requerimientos de atmósfera reducida y microaerófilos |
| Medio de Loeffler | | 35°C | Común |
| Medio de Loeffler | | Ambiente | Común |
| Agar Columbia-Sangre | 35°C | CO ₂ | <i>Streptococcus</i> grupo B, <i>Listeria</i> |

Lectura e interpretación de los cultivos

Una vez producido el desarrollo bacteriano, luego de la incubación a 35°C, observar detenidamente con lupa el tipo de colonia (morfología, disposición, consistencia, tamaño, crecimiento difuso, hemólisis, aspecto).

A partir de los distintos tipos de colonias en los diferentes medios de cultivo sembrados, realizar la coloración de Gram.

En todos los casos, al observar la placa de agar sangre, anotar tipo de hemólisis si hubiere.

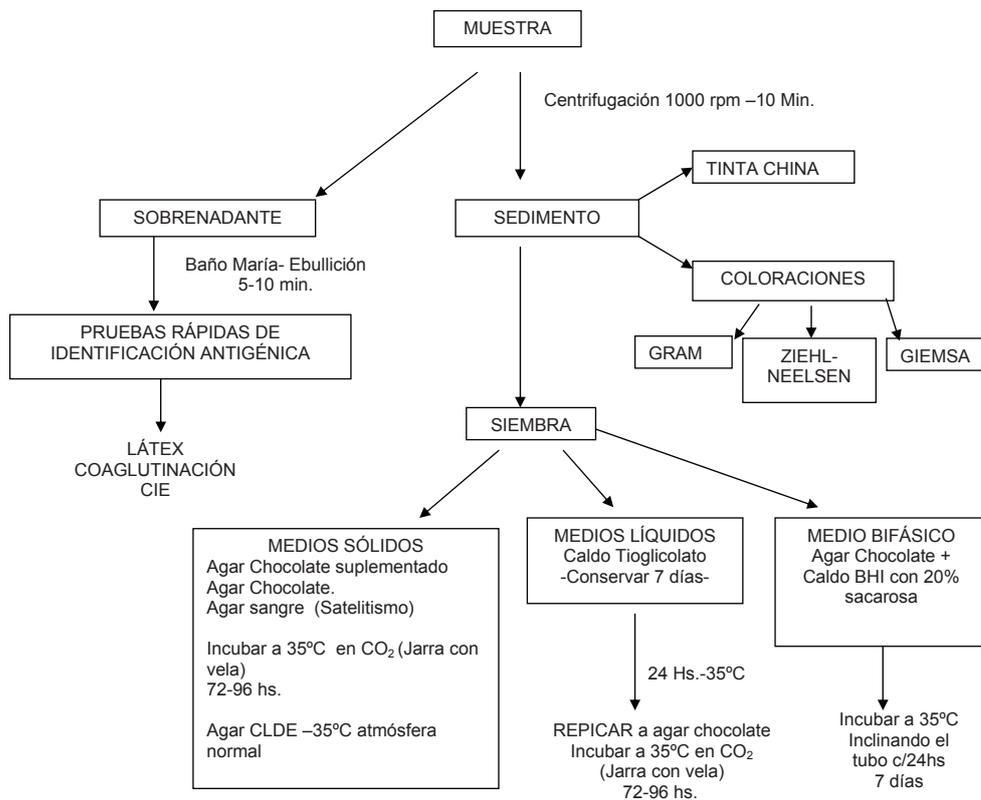
Los microorganismos,

- cocos grampositivos, recuperados en caldos enriquecidos, placas de agar sangre y/o chocolate, incubado en atmósfera húmeda con 3 a 10% de CO₂ (método de la vela)
- bacilos gramnegativos, recuperados de medios enriquecidos (como agar sangre, agar chocolate, entre otros), medios diferenciales (agar lactosados) y caldos.
- cocobacilos gramnegativos (morfología característica de *Haemophilus influenzae*), recuperado de agar chocolate suplementado o no y de agar sangre con satelitismo, incubados en atmósfera húmeda con 3 a 10% de CO₂ (método de la vela).
- diplococos arriñonados (morfología característica de *Neisseria meningitidis*), recuperados de agar chocolate suplementado o no, incubados en atmósfera húmeda con 3 a 10% de CO₂.

Se estudiarán según sus propiedades bioquímicas.

Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

Según sea el microorganismo aislado, se determinará la sensibilidad a los antimicrobianos recomendados.



Solamente para estudios virales o diagnósticos de biología molecular debe ser congelado el LCR.

Esquema 1. Procesamiento de líquido cefalorraquídeo.

Estudios por técnicas inmunoserológicas (Búsqueda de antígenos bacterianos)

Las meningitis bacterianas son infecciones cuya evolución depende de la rapidez de la puesta en marcha de un tratamiento antimicrobiano adecuado.

La técnica de identificación por cultivos es lenta y, en algunos casos, puede ser negativa debido a la aplicación de un tratamiento antimicrobiano previo a la toma de muestra.

En el curso de una infección, ciertas bacterias liberan en los líquidos biológicos antígenos de naturaleza polisídica que pueden detectarse por técnicas inmunológicas.

Las técnicas inmunológicas aplicables al diagnóstico rápido de meningitis bacteriana son diversas, variando cada una de ellas en la sensibilidad para detectar los antígenos:

- RIA (Radio-inmuno-análisis): detecta antígenos presentes en líquidos biológicos en una concentración de 0,5 ng/ml.
- ELISA (Enzimo-inmuno-análisis): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 1 ng/ml.
- CoA (Co-aglutinación): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 10 ng/ml.
- CIE (Contrainmuno-electroforesis): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 50 ng/ml.
- Látex (Aglutinación pasiva): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 50 ng/ml.

- FC (Fijación de complemento): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 500 ng/ml.
- IHP (Inhibición de la hemoaglutinación pasiva): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 500 ng/ml.
- DD (Doble difusión en gel): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 5000 ng/ml.

Debemos recordar que estas técnicas, si bien son sumamente útiles en casos donde el contenido bacteriano en los fluidos biológicos es escaso, de modo que se dificulta la observación en la coloración de Gram y el aislamiento, o bien donde la viabilidad de los organismos haya sido afectada por tratamientos antibióticos previos, **nunca pueden reemplazar a la bacteriología convencional.**

En todos los casos, aunque se realice alguna técnica inmunoserológica para la búsqueda de antígenos bacterianos, los líquidos de punción deben ser sembrados y evaluados por el método clásico.

Cualquiera sea la técnica inmunológica aplicada, debe siempre respetarse estrictamente las indicaciones dadas por el fabricante y nunca debemos extralimitarnos en la interpretación de los resultados, debiendo conocer para ello, previamente, las limitaciones, ventajas y desventajas de cada técnica a utilizar.

• CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE):

El principio básico del método implica la combinación de la electroforesis e inmunodifusión donde en un soporte de vidrio (portaobjeto) cubierto con gel de agarosa, antígeno y anticuerpo, sembrados en pocillos separados realizados en el gel, bajo la acción de un determinado campo eléctrico, migran simultáneamente en direcciones opuestas, obteniéndose la precipitación como resultante en un punto intermedio a sus orígenes.

Durante la electroforesis en medios gelosados a pH 8, antígenos y anticuerpos se cargan negativamente.

Los antígenos migrarán hacia el ánodo, los anticuerpos que se cargan con mucha menor carga negativa y con un potencial eléctrico casi neutro, son “barridos” hacia el cátodo por la corriente de iones buffer o flujo endosmótico originado en el proceso.

La CIE es usada para detectar e identificar antígenos polisacáridos capsulares libres de células que están presentes como resultado de la infección en: fluido cerebro-espinal (LCR), suero u orina, líquido de punción pleural o pleuro-pulmonar, o bien en cultivos de sangre (hemocultivos).

La CIE es también usada para realizar la identificación serológica de cultivos de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

Instrucciones para la remisión de muestras

- Se puede utilizar: LCR, líquido pleural, líquido pleuro-pulmonar, otros líquidos de punción u orina.
- El período de evolución no debe superar los 7 (siete) días.
- Aceptar muestras con diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana e infección respiratoria aguda.
- Las muestras deben remitirse REFRIGERADAS.
- Solicitar siempre un resumen de la historia clínica del paciente. Recordar que es imprescindible conocer la edad del mismo.

- Recordar que durante el inicio del cuadro agudo (primeras 48 a 72 hs) la concentración de antígenos es elevada en los líquidos provenientes de las cavidades infectadas, comenzando la eliminación de los mismos por vía renal a partir del 4to. día, por lo que se recomienda enviar además del líquido de punción, una muestra de orina (entre el 4to. y 7mo. día)

Muestras de orina

Enviar refrigeradas

En orinas turbias centrifugar y trabajar el sobrenadante

Paso 1: 5ml de orina +15 ml etanol frío

Paso 2: Colocar la mezcla en heladera a 4°C –1 hora- o en el freezer – 15 min.

Paso 3: Luego de la refrigeración centrifugar a velocidades altas 10 o 15 min. (Utilizar preferentemente tubos fondo plano) y se formará un sedimento tipo pastilla en el fondo, volcar el sobrenadante.

Paso 4: Dejar escurrir el excedente alcohólico sobre un papel de filtro, con el tubo boca abajo.

Paso 5: Agregar 0,30 ml de Solución Fisiológica.

Paso 6: Sembrar 10 µl en el pocillo correspondiente a la muestra.

Muestras de líquido cefalorraquídeo y/o pleural

Si son purulentos centrifugar (al sobrenadante diluirlo 1/20 con SF)

Sembrar varias diluciones del material (1/5; 1/10; 1/20)

Cuando existan doble halos (entrecruzamiento) calentar 5 min. BM ebullición.

Técnica:

- 1- Colocar sobre un portaobjetos desengrasado una o dos gotas de agarosa al 1%. Distribuir sobre toda la superficie con el dedo.

Dejar secar 24 hs a 37°C.

Puede guardarse durante 2 meses a temperatura ambiente (le da al portaobjeto característica rugosa que evitará que el gel de agarosa se resbale en el vidrio).

- 2- Colocar una cubierta de 3 ml de agarosa al 1% en buffer de corrida. Dejar solidificar a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 3- Realizar la perforación dejando una distancia entre pocillos de 6 mm. Cada pocillo debe tener un diámetro de 3 mm.
- 4- La siembra se realiza con 10 µl de la muestra incógnita y 10 µl del antisuero específico.

Al realizar la siembra colocar el portaobjeto en cámara húmeda.

Tener cuidado al cargar los pocillos que no se formen burbujas de aire.

- 5- Ubicar el portaobjeto en la cuba de modo tal que el antígeno se encuentre del lado del cátodo y el pocillo del antisuero del lado del ánodo. Hacer contacto entre el buffer y el portaobjeto, usar para ello tiras de papel de filtro.
- 6- Encender la fuente de poder. La corrida se efectúa por 40 minutos a un voltaje de 100, o utilizando un amperaje de 2 a 3 por portaobjeto.
- 7- Cumplido el tiempo de corrida, desconectar la fuente de poder y observar con muy buena luz y una lupa la formación de bandas de precipitación entre los pocillos de antígenos y anticuerpos.

- **AGLUTINACIÓN CON PARTÍCULAS DE LÁTEX SENSIBILIZADAS**

Consiste en una técnica de aglutinación rápida realizada sobre tarjeta oscura para detectar antígenos.

Se utilizan partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos dirigidos contra *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* (diferentes serotipos y grupos obtenidos por inoculación de los mismos en conejo o bien de origen monoclonal).

Esta técnica puede ser utilizada para detectar antígenos de naturaleza poliosídica en líquidos de punción (LCR, líquidos pulmonares o pleuro-pulmonares) y para la identificación de cepas aisladas a partir de productos patológicos.

Para la realización respetar estrictamente las indicaciones del fabricante sobre todo en lo referido al tratamiento de los líquidos.

En general, es necesario utilizar el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación del LCR u otro líquido a utilizar.

El sobrenadante se calienta a 100°C durante 10 minutos a fin de permitir la liberación completa de los antígenos.

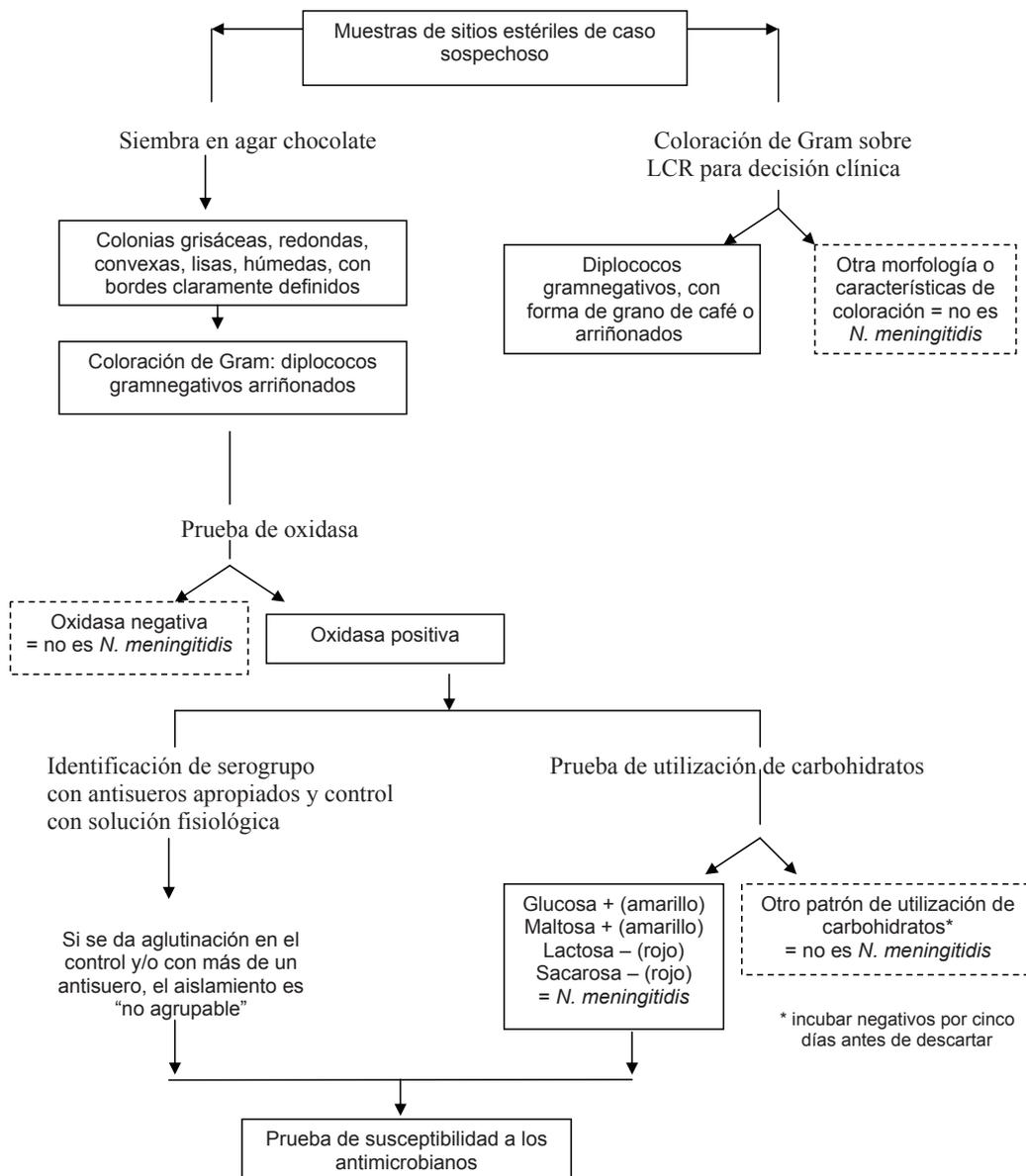
Luego de que se enfríe, se realizan las reacciones de aglutinación con los antiseros disponibles en el equipo.

- **COAGLUTINACIÓN**

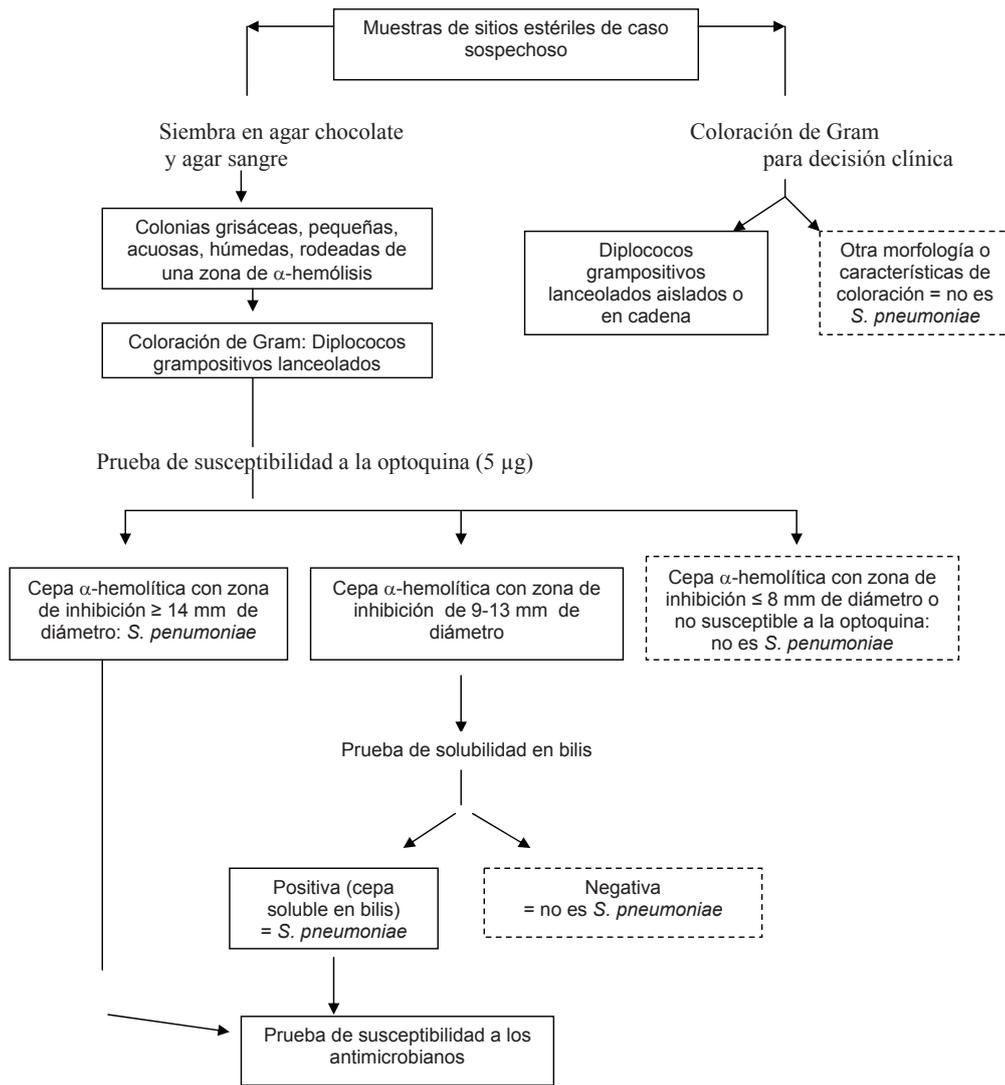
La coaglutinación tiene los mismos fundamentos que la aglutinación con partículas de látex, solo que en este caso los anticuerpos dirigidos contra *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* (diferentes serotipos y grupos obtenidos por inoculación de los mismos en conejo o bien de origen monoclonal) están ligados a una cepa de *Staphylococcus aureus* rico en proteína A (cepa Cowan) con gran capacidad de ligar la porción Fc de la Inmunoglobulina G, dejando la porción Fab con habilidad para unirse a cualquier antígeno homólogo.

Los pasos de la técnica en general son similares a la anterior, pero siempre se debe atender a las indicaciones del fabricante.

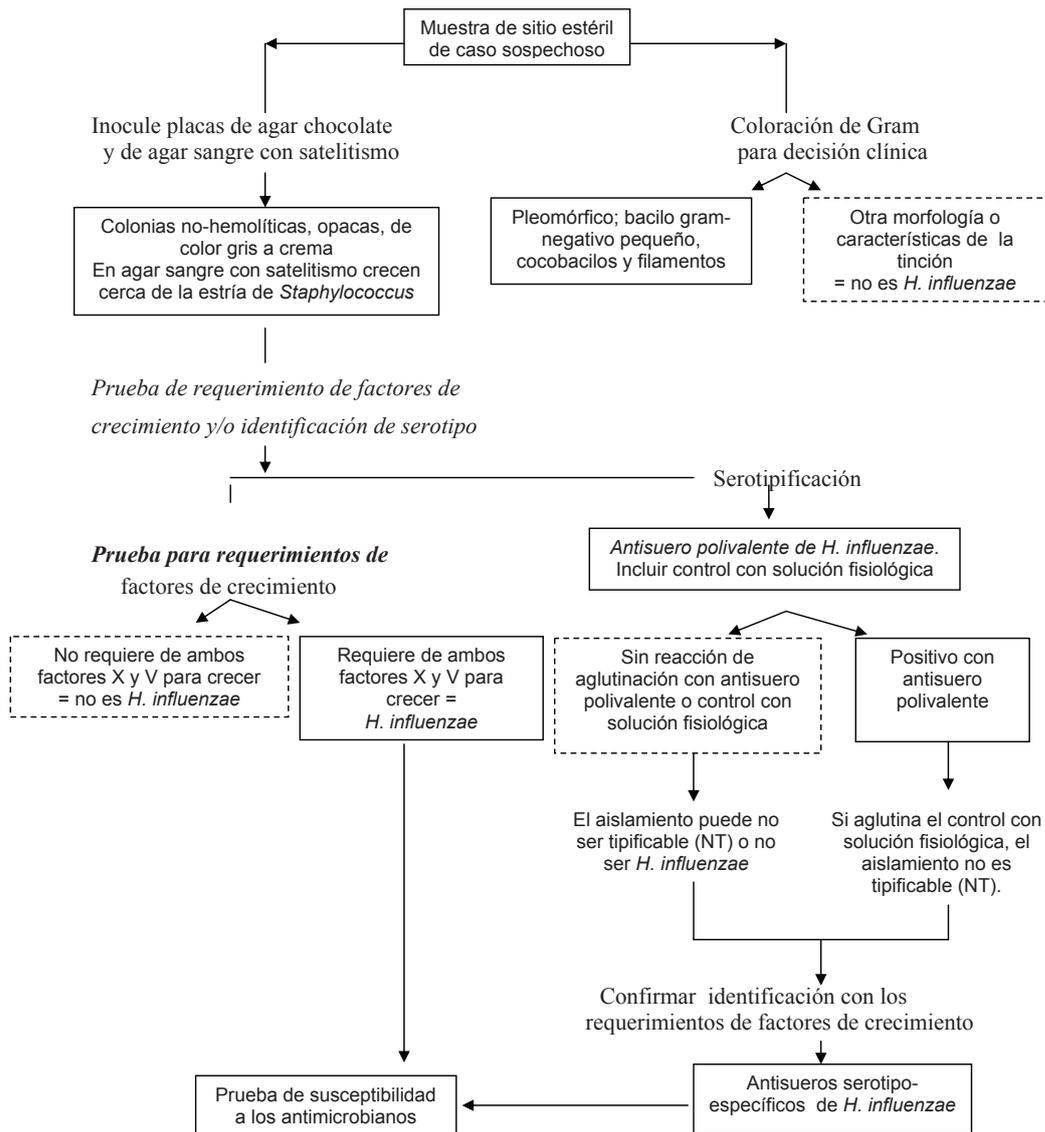
Es obligatorio controlar la técnica con controles positivos y negativos.



Esquema 2. Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Neisseria meningitidis*. (Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).



Esquema 3. Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*. (Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).



Esquema 4. Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Haemophilus influenzae*. (Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison-Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison 2002-2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330home-page>.
- Baron, S. (Ed). Medical Microbiology. 4th Ed. The University of Texas Medical Branch (UTMB). <http://gsbs.utmb.edu>.
- Bonadio, W. A. The cerebrospinal fluid: physiologic aspects and alterations associated with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 11(6):423-431.1992.
- Ceimos, M.; Fraire, C.; Paganini, H. Asociación Argentina de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Entre Ríos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Infecciones del Sistema Nervioso Central. Imprenta Macagno SRL. Santa Fe.
- Hasbun, R.; Abrahams, J.; Jekel, J. Quagliarello V. J. Computed tomography of the head before lumbar puncture in adults with suspected meningitis. *N Engl J Med* 345(24):1727-1733. 2001.
- Hunt, R. (Ed). Microbiology and Immunology on-line. University of South California. School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu>
- Isenberg, H. D. (Ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM press, Whashington D.C. 1998.
- Popovic, T.; Ajello, G.; Facklam, R. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1999.
- Tunkel, A. R.; Hartman, B. J.; Kaplan, S. L.; Kaufman, B. A.; Roos, K. L.; Scheld, W. M.; Whitley, R. J. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 39(9):1267-84. 2004.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Pegels, E.; Husulak, E.; Oviedo, P.; Villalba, V.; Miranda, A. M. Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. 2001.

GUÍA N° 6

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)

EL COPROCULTIVO

● RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

La muestra debe ser representativa en calidad y cantidad.

La muestra óptima es la materia fecal (MF) recién emitida, por deposición espontánea, sin la ingesta previa de laxantes, colocada en frasco estéril o en hisopo estéril en un medio de transporte, y remitida lo más rápidamente posible al laboratorio.

Deberá recogerse en la primera fase de la enfermedad y en lo posible antes de iniciar el tratamiento antibiótico.

Transportar en cadena de frío, conservar en heladera a 4-8°C, hasta su procesamiento.

No congelar.

La muestra debe ser identificada y acompañada de la mayor cantidad de datos clínicos y epidemiológicos posibles:

- nombre
- edad
- procedencia del paciente
- tipo de muestra (MF recién emitida, hisopado anal, hisopado rectal)
- signos y síntomas (deshidratación, desnutrición, fiebre, vómitos)
- tratamiento antibiótico previo

Otros datos de valor epidemiológico:

- condición de ambulatorio o no
- agua de consumo
- tratamiento de excretas y residuos

En la práctica se utiliza el hisopado rectal en casos de ser necesario tomar una muestra de MF de inmediato, o cuando el envío rápido de la muestra al laboratorio plantea problemas.

Cuando se sospecha que la infección es causada por bacterias que invaden la mucosa del intestino bajo (por ej. *Shigella*), es preferible tomar hisopados rectales ya que estos se recogen restregando la mucosa intestinal.

En caso de transcurrir más de dos horas antes de su procesamiento, se tomará una pequeña cantidad de muestra mediante la inserción de un hisopo en las heces, haciéndolo girar (hisopado fecal), introduciéndolo luego en un medio de transporte.

Si están presentes fragmentos de mucosidades o epitelio, deberán transferirse al medio de transporte.

Para la recuperación de *Shigella* spp. es importante realizar la siembra de inmediato.

● CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LA MATERIA FECAL (MF)

Registrar las características de la muestra:

- consistencia (forme, diarreica, acuosa, pastosa, semi-líquida-líquida)
- color

y la presencia de:

- sangre macroscópica
- mucus
- pus

● EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA MF

Examen en fresco:

Realizar una suspensión densa de la muestra con solución fisiológica (SF), o agua destilada estéril, y observar al microscopio en 400X entre porta y cubreobjeto.

Investigar la presencia de leucocitos, hematíes, mucus y parásitos.

Se considera que una muestra presenta respuesta inflamatoria positiva cuando presenta: más de 5 leucocitos por campo o un glóbulo de pus en 20 campos 400X.

● INOCULACIÓN EN MEDIOS PRIMARIOS DE AISLAMIENTO

Suspender las heces en 1-2 ml de SF estéril, eligiendo las partes donde se observe mucus, sangre y/o pus. Las heces líquidas no necesitan solución salina.

Para medios de alta selectividad, usar un inóculo denso (tres ansadas), y para medios de baja selectividad, se empleará un inóculo ligero (1 ansada).

● INVESTIGACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

Sembrar para aislamiento una placa de agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) u otro agar lactosado (CLDE, MacConkey, u otro.). Incubar 24 hs a 35°C.

Observar las colonias registrando sus características.

Seleccionar 5 colonias fermentadoras de lactosa y transferir cada una de ellas a estrías de Agar Nutritivo (AN). Incubar 24 hs a 35°C.

Realizar tipificación mínima: Indol- Rojo de Metilo-Voges Proskauer-Citrato (IMVIC).

Seleccionar las colonias positivas para *E. coli* según IMVIC, para continuar el estudio.

Una vez realizada la identificación bioquímica, para conferir su rol etiológico, la bacteria debe ser caracterizada según la categoría a la que pertenece.

Dichas categorías pueden ser estudiadas por cultivos celulares (células HEp-2) detectando la presencia de diferentes patrones: adherencia localizada (ECEP, ECEH), adherencia difusa (ECAD) o adherencia agregativa (ECEA), por técnicas moleculares (PCR, sondas), por enzoinmuno-ensayos (ECET, ECEI) o métodos biológicos.

A las cepas citrato positivas, realizar serología polivalente para la búsqueda de *Salmonella* (fermentadoras de lactosa, que existen aunque en muy bajo porcentaje).

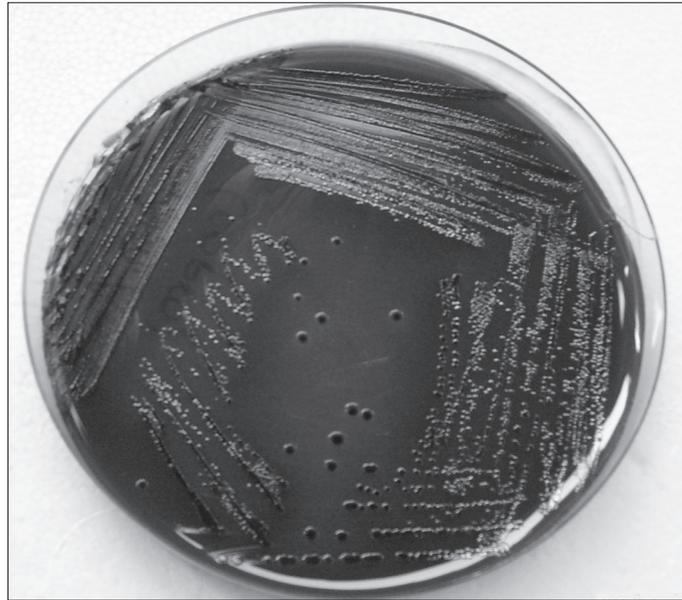


Foto 1. *Escherichia coli* en EMB.

1. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATÓGENO (ECEP), FIGURA 1
2. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (ECEA) FIGURA 2
3. *ESCHERICHIA COLI* ENTERODIFUSA (ECED) FIGURA 3

• *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÉNICO (ECET)

De las estrías de AN- realizar, según técnica:

Métodos “in vivo”

- asa ligada de intestino de conejo
- test del ratón lactante

Métodos “in vitro”

- ELISA-GM1 con anticuerpos poli y monoclonales para la búsqueda de toxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST).
- inmunodifusión, hemaglutinación pasiva, y otras.

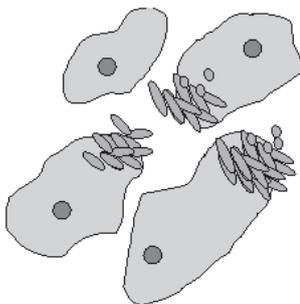


Figura 1. Representación esquemática de adherencia localizada en cultivos celulares.

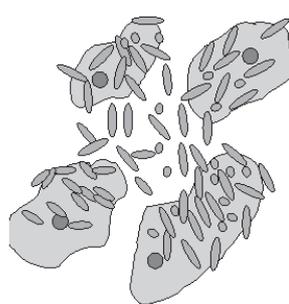


Figura 2. Representación esquemática de adherencia agregativa en cultivos celulares.

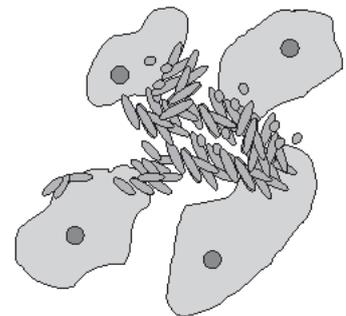


Figura 3. Representación esquemática de adherencia difusa en cultivos celulares.

• *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICO (ECEH)

Todo paciente con clínica sospechosa de Síndrome Urémico Hemolítico (S.U.H.) y/o muestra de MF sin leucocitos o muy escasos y abundante sangre, debe ser sembrada para la búsqueda de ECEH.

El Servicio de Fisopatogenia del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” recomienda recolectar la MF lo antes posible después del inicio de la diarrea, ya que la excreción de ECEH se produce en los primeros 7 días.

El paciente no debe estar con tratamiento antibiótico. En caso contrario, recolectar la MF después de suspender la antibioticoterapia por no menos de 48 hs.

La MF recolectada debe ser refrigerada y procesada dentro de las 2 horas de obtenida. De no ser posible, se la deberá colocar en un medio de transporte (Cary Blair, Stuart, Amies o solución bufferada con glicerol). Si el procesamiento se efectúa dentro de los 2-3 días de obtenida la muestra, el medio de transporte debe ser refrigerado, en caso contrario congelar a -70°C .

Aislamiento y caracterización de ECEH en Materia Fecal (MF)

El agar MacConkey Sorbitol, es el más antiguamente usado para detectar *E. coli* O157: H7 y O157: HNM (H no móvil) dada la incapacidad de estos microorganismos para fermentar el sorbitol, luego de una incubación a 35°C durante 18–24 hs.

Sin embargo la sensibilidad del medio se ve disminuida en función del inóculo del patógeno a estudiar y la gran cantidad de microorganismos habituales del contenido fecal.

Se recomienda el cultivo previo en medios de enriquecimiento suplementados con inhibidores de la flora fecal acompañante, como cefixima y el telurito de potasio.

Otros medios de cultivo, basados en sus propiedades bioquímicas, identifican a *E. coli* O157: H7 dándole a la colonia un color característico que permite reconocerla fácilmente.

Una vez caracterizadas bioquímicamente como *E. coli* se las debe sero-agrupar.

El seroagrupamiento consiste en detectar la presencia del antígeno O157 mediante una reacción Ag–Ac utilizando antisueros policlonales anti O157. Existen reactivos comerciales de aglutinación en placa, en general constituidos por partículas de látex recubiertas de anticuerpos anti O157 y otros.

La serotipificación se efectúa o confirma en los laboratorios de referencia y consiste en la detección del antígeno flagelar previa estimulación de la movilidad en medios específicos (medio Craige).

Se deberá comprobar la producción de la toxina por estas cepas, utilizando ensayos inmuno - enzimáticos (ELISA) o métodos inmunocromatográficos.

También podrá utilizarse la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la búsqueda de genes que codifican para la producción de toxina.

La implementación de la PCR, técnica sensible, específica y rápida que detecta cepas de ECEH O157 y no O157, permite el diagnóstico temprano de la diarreas asociadas a este microorganismo.

Dado que en cepas de *E. coli* O157 existe una estrecha correlación entre la producción de toxina (Stx) y de enterohemolisina (Hly), se considera que la detección de esta última puede ser un marcador epidemiológico útil para seleccionar rápidamente probables cepas de ECEH.

Se emplean placas con agar sangre suplementada con 10 mM de Cl_2Ca preparadas con glóbulos rojos de oveja defibrinados y lavados. Como control se emplean placas de agar sangre de oveja sin lavar y sin el agregado de Cl_2Ca .

A partir de cultivos jóvenes se siembran en paralelo ambas placas.

Luego de 3 hs. de incubación se realiza una primera lectura para la detección de α -hemolisina (α -Hly) y se vuelve a incubar hasta 20-22 hs. para la segunda lectura de hemólisis típica (zona muy fina alrededor de la colonia).

En cada placa se pueden ensayar varias cepas y el único requisito es emplear sangre fresca de no más de 10 días.

La concordancia entre la producción de Stx y de E-Hly supera el 90%.

Ya ha sido demostrado que las técnicas de separación inmunomagnética permiten la detección de *E. coli* O157 elevando la sensibilidad a niveles tales como detectar 100 UFC por gr. de materia fecal en presencia de 10^7 UFC bacterias coliformes acompañantes, separando así los microorganismos de interés.

Si bien estas últimas técnicas están diseñadas en Argentina, para ser usadas en alimentos, podrían adaptarse a muestras fecales en caso necesario.

Se han desarrollado métodos rápidos de enzoinmunoensayo de tamizaje de *E. coli* O157 y otros serotipos de ECEH en alimentos, basados en la incorporación de anticuerpos contra el antígeno somático O157, el flagelar H7, y las toxinas.

También existen métodos inmunológicos de tipo cromatográficos donde los anticuerpos marcados reaccionan con los antígenos O157 dentro de una muestra preenriquecida y que ha sido corrida sobre un soporte poroso (por ej. de silicagel). Estos test inmunocromatográficos están disponibles en la Argentina para la pesquisa rápida de antígenos O157 y la detección de vero toxinas.

Conociendo las características microbiológicas de ECEH, la probabilidad de recuperación de la bacteria en materia fecal, y la necesidad de brindar un diagnóstico rápido, es posible diseñar un algoritmo de diagnóstico según las posibilidades de cada laboratorio.

El Centro Nacional de Referencia (INEI- ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán) recomienda el siguiente esquema de diagnóstico (ver pág. 94).

Detección de la toxina libre en MF:

- Ensayo de citotoxicidad específica en células Vero: esta técnica es considerada por su sensibilidad como la "gold standard".

Permite detectar Stx1, Stx2 y sus variantes.

La neutralización mediante la utilización de antisueros policlonales o monoclonales le confiere especificidad. Este ensayo permite demostrar la presencia de Stx en extractos filtrados de materia fecal o de cultivos bacterianos. Sin embargo, es laboriosa, de alto costo y su uso está restringido a los laboratorios de referencia.

- Ensayos inmunoenzimáticos: existen equipos comerciales que permiten detectar Stx1, Stx2 juntas o separadas.

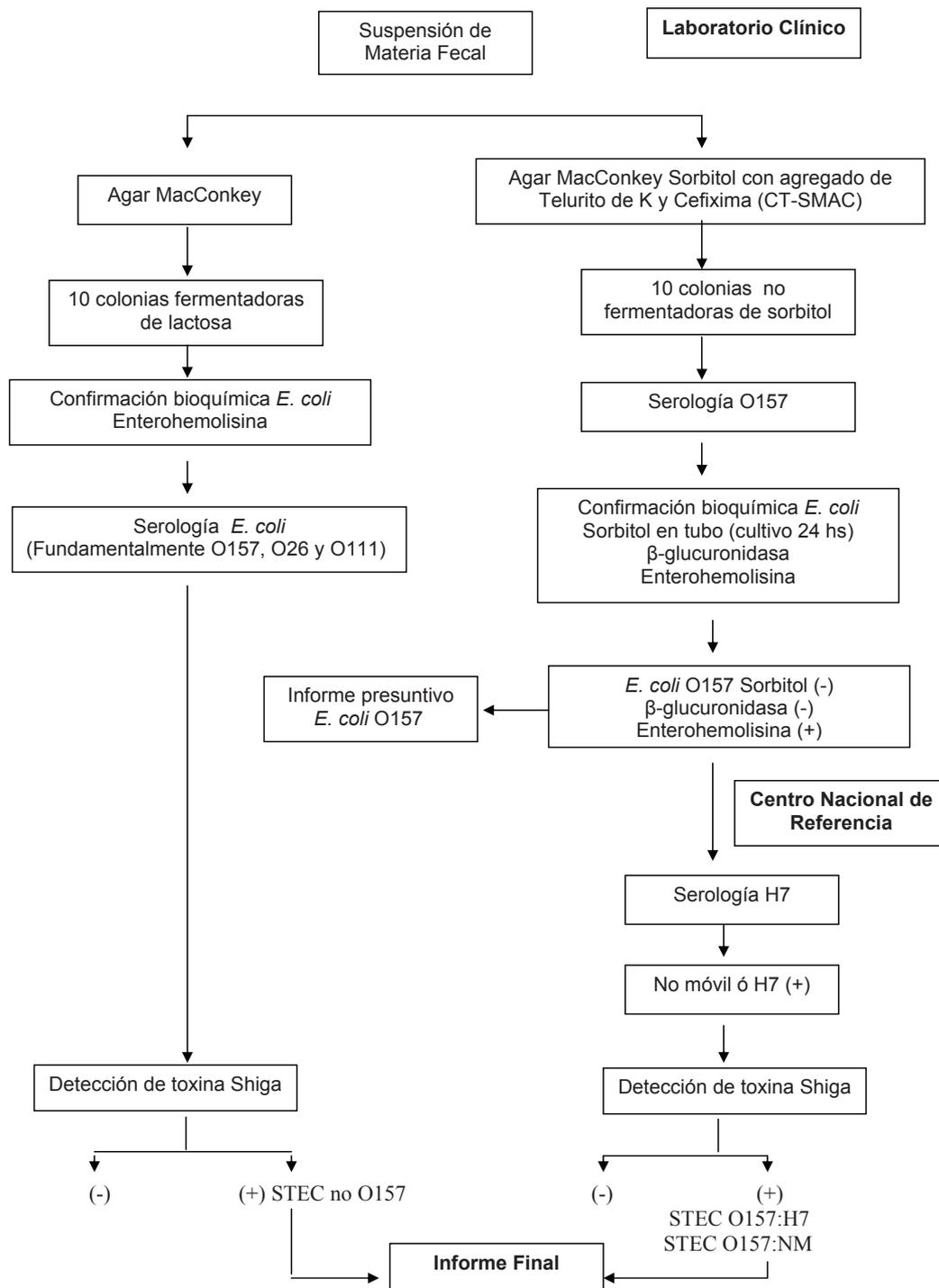
Métodos serológicos: Detección de anticuerpos marcadores

Se deben tomar 2 muestras de suero del paciente: una al inicio de la enfermedad y la segunda a los 15 – 20 días.

El ensayo se realiza en células Vero utilizando toxinas de cepas de referencia.

Se considera serconversión un aumento en el título de anticuerpos mayor o igual a 4 entre la 1° y la 2° muestra.

También podrían adaptarse técnicas inmunoenzimáticas o inmunocromatográficas.



Esquema 1. Esquema para el diagnóstico de ECEH a partir de materia fecal.

• **ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVA (ECEI)**

La MF se debe sembrar en un medio de enriquecimiento: Caldo Selenito, utilizando un inóculo denso. Incubar a 35°C 18 hs.

Una vez cumplida la mencionada incubación se transfieren tres ansadas del Caldo Selenito a un Agar Salmonella-Shigella (SS) u otro medio lactosado (Agar Xilosa-Lactosa-desoxicolato (XLD), MacConkey, EMB u otro). Incubar 24 hs a 35°C.

Seleccionar del EMB las colonias no fermentadoras de lactosa, si las hubiere y del SS las colonias no fermentadoras de lactosa.

Si la serología con sueros polivalentes para *Shigella* es negativa, confirmar con pruebas bioquímicas probable cepa ECEI.

Para ECEI, confirmar con el test de queratoconjuntivitis en ojo de cobayo (Test de Séreny) y ELISA.

La presencia de respuesta inflamatoria positiva (más de 5 leucocitos por campo o un glóbulo de pus en 20 campos 400X) hace sospechar la presencia de un mecanismo invasivo, característico de ECEI.

● **INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. Y *SHIGELLA* SPP.**

Sembrar la MF en un medio de enriquecimiento: Caldo Selenito, utilizando un inóculo denso.

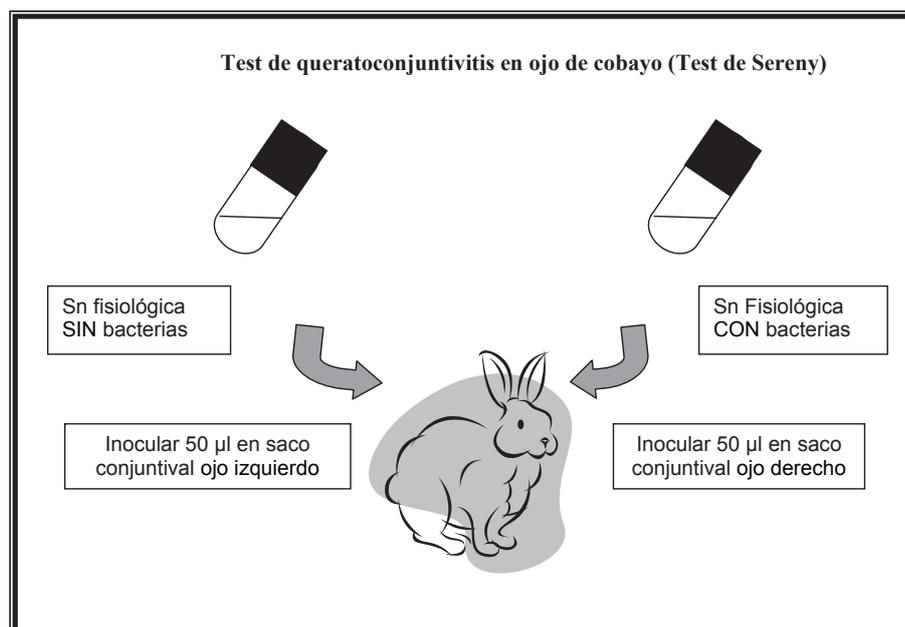
Incubar a 35°C durante no más de 18 hs.

Luego de cumplida la incubación se transfieren tres ansadas del Caldo Selenito a una placa de agar Salmonella-Shigella (SS) u otro medio lactosado (Agar Xilosa-Lactosa-desoxicolato (XLD), MacConkey, EMB u otro). Incubar 24 hs a 35°C.

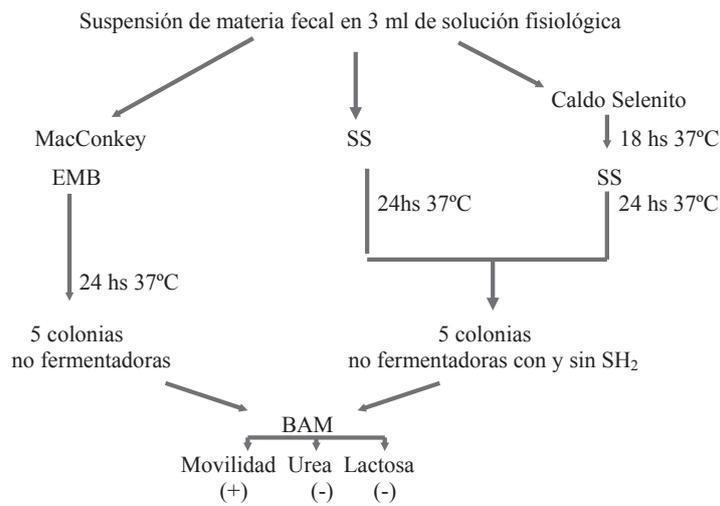
Seleccionar del EMB las colonias no fermentadoras de lactosa, si las hubiere y del SS las colonias no fermentadoras de lactosa con y sin punto negro (productoras de SH₂).

Interpretación

1. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (-), con serología (-): Informar: *Shigella* spp.
2. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (-), con serología (+): Informar: *Shigella dysenteriae*; *S. sonnei*; *S. flexneri*; *S. boydii* según corresponda.
3. Serología cruzada y pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp.; incluyendo acetato (-): Informar: *Shigella* spp.
4. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (+), indol (+), con serología (-): Informar: *Escherichia coli* lactosa (-).



Esquema 2.

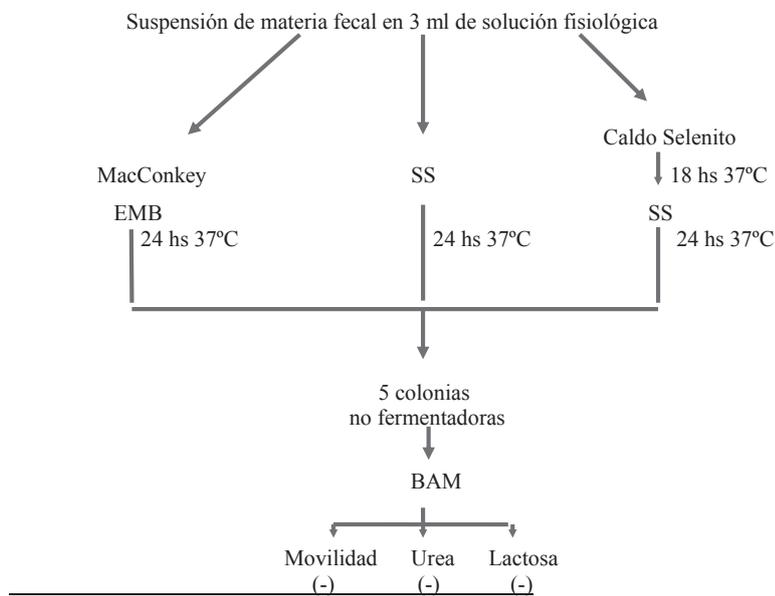


TSI: Alcalino/Acido Gas (-/+) SH₂ (+)

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|------|--------------|--------|
| I | M | Vi | C | Urea | Fenilalanina | Lisina |
| (-) | (+) | (-) | (v) | (-) | (-) | (+) |

Serología con antisueros de *Salmonella*: (+)

Esquema 3: Esquema para el diagnóstico de *Salmonella* spp. a partir de materia fecal.



TSI: Alcalino/Ácido Gas (-) SH₂ (-)

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|--------|------|-----------------|
| I | M | Vi | C | Lisina | Urea | Acetato (48 hs) |
| (v) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

Serología con antisueros de *Shigella*: (+)

Esquema 4: Esquema para el diagnóstico de *Shigella* spp. a partir de materia fecal.

5. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., acetato (+) y serología (+): Informar: *Escherichia coli* lactosa (-).
6. Seleccionar los BAM sin cambio (cepas no fermentadoras de lactosa y no productoras de ureasa), móviles (ver esquema para *Salmonella* spp.) o inmóviles (ver esquema para *Shigella* spp.) y transferir a un agar Hierro Triple Azúcar (TSI). Incubar 24 hs a 35°C.
7. A los TSI con fondo ácido, pico alcalino y sin gas ni SH₂ provenientes de BAM sin cambio movilidad negativa; realizar serología para *Shigella* con sueros polivalentes.
8. A los TSI con fondo ácido, pico alcalino y producción de SH₂ con o sin gas provenientes de BAM sin cambio movilidad positiva; realizar serología para *Salmonella* con sueros polivalentes. De ser negativa, confirmar con pruebas bioquímicas de que no se trate de una cepa perteneciente a la Familia *Proteae*.

● INVESTIGACIÓN DE *AEROMONAS* SPP.

Sembrar la MF en una placa de agar sangre (AS). Incubar 18 hs a 35°C.

Seleccionar 5 a 6 colonias β-hemolíticas y 5 a 6 colonias no hemolíticas y transferirlas a estrías de agar nutritivo (AN). Incubar 24 hs a 35°C.

De las estrías de AN, realizar la determinación de la producción de oxidasa (con discos o con papel de filtro embebido en una solución acuosa al 1% de oxalato de p-aminodimetilánilina).

A las cepas productoras de oxidasa, transferirlas a TSI y BAM.

Seleccionar las cepas cuyos BAM sean sin cambio y móviles, TSI ácido/ácido o alcalino/ácido, con o sin gas, SH₂ negativo. Realizar pruebas bioquímicas mínimas como producción de indol y de desoxirribonucleasa (DNAsa) para una identificación presuntiva.

Recordar que, dada la similitud en sus características fenotípicas, el género *Aeromonas* debe ser diferenciado de los géneros *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*.

En caso de sospecha de la presencia de *Vibrio cholerae*, realizar serología para *Vibrio* con antisueros polivalentes y comunicar inmediatamente a las autoridades correspondientes, enviando la cepa sospechosa al Laboratorio de Referencia.

● INVESTIGACIÓN DE *CAMPYLOBACTER* SPP

Sembrar la MF directamente en medio de enriquecimiento CHAN, utilizando un inóculo denso. Incubar 24 a 48 hs a 42°C en atmósfera de 10% de H₂, 10% de CO₂ y 80% de N₂, mediante el método de evacuación-reemplazo.



Foto 6. *Aeromonas* spp. en placa de agar sangre.

Atmósfera opcional: Recipiente con vela con medios suplementados con FBP; Sistema Gas-Pack sin catalizador de paladio.

Subcultivar el medio CHAN en agar Skirrow modificado. Utilizar el sistema de incubación (tiempo, temperatura y atmósfera) ya descrito.

Seleccionar colonias características en medio Skirrow y realizar:

- Examen en fresco entre porta y cubre para ver la movilidad característica.

Utilizar agua estéril para realizar la suspensión ya que la solución fisiológica inhibe la movilidad.

- Coloración de Carbol fucsina a fin de observar la morfología característica.
- Prueba de la Catalasa.
- Prueba de la Oxidasa.

Si resultan positivas, realizar las pruebas de susceptibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina, por el método de disco (Kirby-Bauer).

● INVESTIGACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE*

Toma de muestra:

La mejor muestra es la materia fecal, la cual será tomada por un hisopado rectal o en caso de diarrea acuosa, directamente de la evacuación espontánea en frasco estéril, ya que su alcalinidad permite mantener viable a *V. cholerae*.

La muestra no debe tomarse del recipiente donde el enfermo ha hecho la deposición ya que puede haber contaminación con defecaciones anteriores, en cuyo caso pueden obtenerse resultados falsos positivos.

Por otra parte, si el recipiente ha sido desinfectado y no se ha eliminado convenientemente el principio activo del desinfectante utilizado, el análisis bacteriológico podría dar resultados falsos negativos.

Transporte de la muestra

El medio de transporte de elección es el Cary Blair. Si no se dispone de este medio se puede utilizar agua peptonada alcalina (APA) pH 8,6, teniendo en cuenta de que es un caldo de enriquecimiento y no deben pasar más de 8 horas para procesar la MF luego de ser colocada en este medio.

En caso de que transcurra más tiempo hay que transferir 2 o 3 ansadas de este cultivo a un nuevo tubo con APA.

Las muestras deben transportarse a **temperatura ambiente**. Si la temperatura ambiente es muy elevada, pueden utilizarse refrigerantes, pero sin llegar jamás a congelarlas.

Técnica de aislamiento

El APA facilita el aislamiento de vibriones de personas convalecientes y de portadores y no se necesita para los casos agudos.

El APA se inocula con dos o tres ansadas de una suspensión de materia fecal o hisopado rectal.

Se incuba por espacio de 6 a 8 horas.

Con un ansa, tomando de la película superficial, se siembran placas de agar tripticosa soya (ATS) o agar sangre (AS) y agar TCBS (tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa).

El APA no debe incubarse más de 8 horas.

Vibrio cholerae prolifera rápidamente en este medio y transcurrido un período de 6 a 8 horas, estará presente en cantidades mayores que los organismos que no pertenecen a esta especie.

Después de 8 horas puede ocurrir que el número de otros organismos sea superior al de *Vibrio cholerae* y en estos casos conviene transferir 2 o 3 ansadas de este cultivo a un nuevo tubo con APA, como lo señalamos anteriormente.

Siembra en medios selectivos y no selectivos (Ver Esquema 5):

Recordar que la prueba de oxidasa no puede realizarse directamente del TCBS, por la posibilidad de obtener falsos negativos por la formación de productos de la fermentación ácida de la sacarosa.

Se debe realizar esta prueba tanto a las colonias sospechosas (amarillas) como a las azul-verdosas, si las hubiera, ya que podrían pertenecer a una especie diferente (no *cholerae*).

Hay que enfatizar que no solo *V. cholerae* da colonias amarillas en TCBS, ya que también *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissi*, *V. metschnikovii* y algunos biotipos de *V. vulnificus* pueden presentar esta característica colonial, debido a que todos ellos fermentan sacarosa.

La reacción serológica no debe realizarse directamente del TCBS, porque las colonias de *V. cholerae*, en dicho medio, generalmente son pegajosas lo que dificulta la aglutinación directa.

Es por estas razones que tanto la prueba de oxidasa como la serología se realizan a partir de colonias provenientes del ATS o del AS.

Pruebas bioquímicas complementarias:

Luego de la realización de las pruebas mínimas referidas en el esquema de siembra, se realizan pruebas complementarias para diferenciar *Vibrio cholerae* de otros organismos relacionados.

Pruebas especiales:

Diferenciación de *Vibrio cholerae* O1 en biotipos clásicos o El Tor.

| PRUEBAS | BIOTIPO | |
|---|------------------|------------------|
| | CLÁSICO | EL TOR |
| Hemaglutinación de eritrocitos de pollo u oveja | - | + |
| Hemólisis de eritrocitos de oveja | - | + ⁽¹⁾ |
| Resistencia a la polimixina B | S | R |
| Voges-Proskauer | - ⁽²⁾ | + |

⁽¹⁾ No todos los biotipos El Tor son positivos

⁽²⁾ Las reacciones de Voges-Proskauer no son siempre típicas.

Envío y transporte de cepas para su confirmación

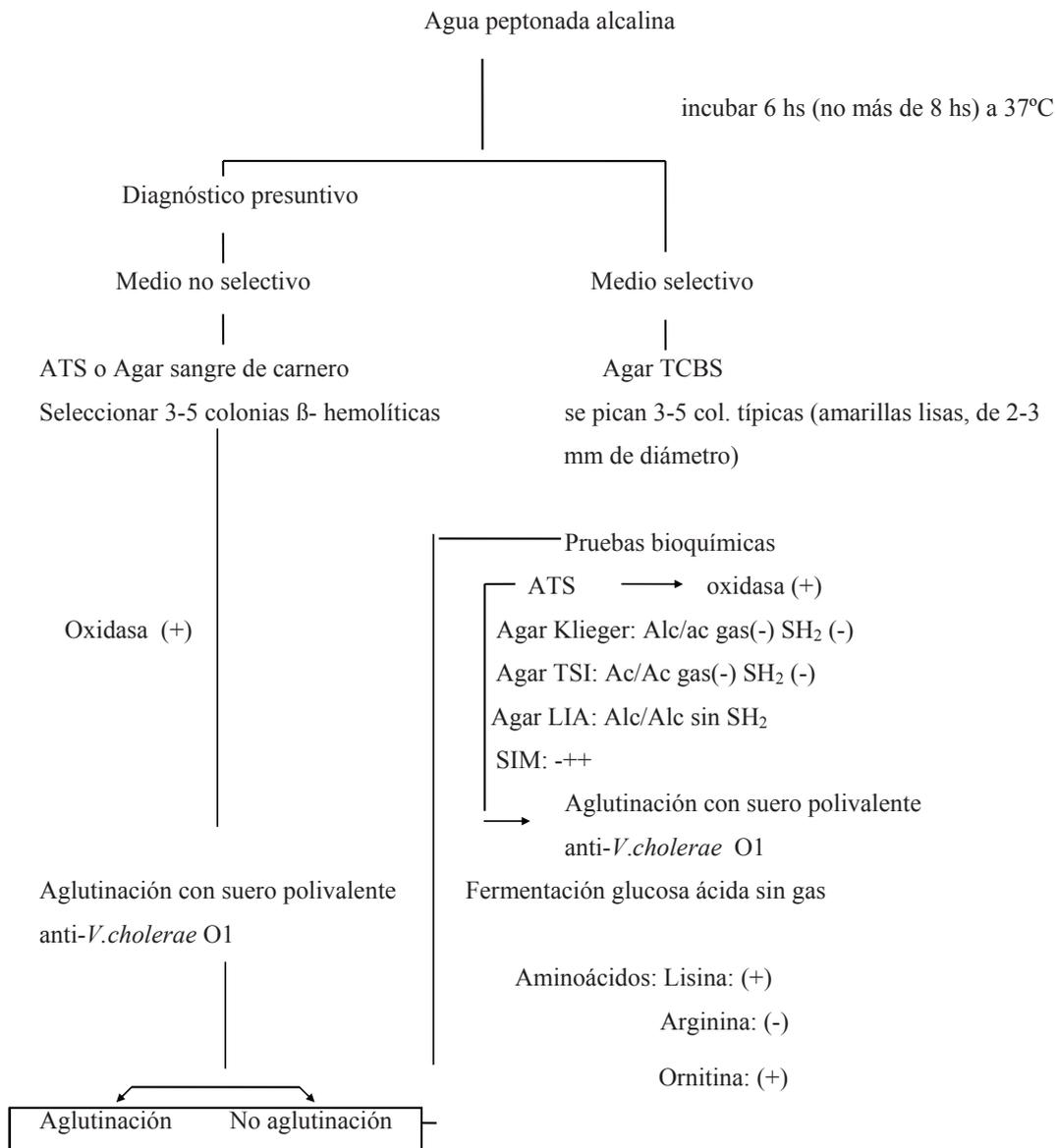
Toda cepa sospechosa de ser ECEI, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio* y/o *Aeromonas* debe ser enviada a un Laboratorio Referencia, para su confirmación bioquímica, serológica y estudio de la producción de enterotoxina.

Las cepas se enviarán en agar nutritivo o ATS en estría o por punción en agar blando (caldo nutritivo con 0,75% de agar) en tubos a rosca o tubos de hemólisis con tapón de

goma en cajas convenientemente acondicionadas, siguiendo las normas de envío de material biológico.

No enviar las cepas en TSI, ni en ningún medio que contenga carbohidratos o inhibidores.

Para el estudio de toxina colérica, es importante que el cultivo enviado tenga el menor número de pasajes posibles para evitar la pérdida de la toxicidad.



NO hacer serología de medios selectivos

Esquema 5. Esquema de siembra de *Vibrio cholerae*.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Afazani, A.; Beltramino, D.; Bruno, M. E.; Cairoli, H.; Caro, M. B.; Cervetto, J. L.; Daniel, I. S.; De Rosa, S.; Escobal, N.; Figueroa Turienzo, C.; Garibotto, L.; Giúdice, I.; Guastavino, E.; Hoxter, S.; Kenny, P.; Lapaco, M.; López Casariego, V.; Mazza, C. S.; Muñecas, G.; Pangaro, G.; Pedra, C.; Pérez, E.; Piazza, N.; Rocca, L. M.; Ruvinsky, R. O.; Sordó, M. E.; Sverdloff, H.; Toca, M. C.; Totoro, A.; Varela, A.; Zlatkes, R. Consenso nacional. Diarrea aguda en la infancia. Actualización sobre criterios de diagnóstico y tratamiento. <http://www.sap.org.ar/archivos/educación/consensos>
- Bacteriology at UW. Department of Bacteriology Madison-Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison 2002-2004. <http://www.bact.wisc.edu/bact330/bact330homepage>
- Benassi, F. O.; Martínez Vázquez, F.; Eiguer, T.; Martos, M. A.; Vergara, M.; Bendersky, S. *Salmonella* en aguas de recreación de la ciudad de Posadas. Correo de Ciencia y Tecnología de Misiones. Año 0, N° 1. 1991.
- Binsztein, N.; De Petris, A.; Eiguer, T.; Maurel, D.; Nader, O.; Notario, R.; Novillo, A.; Picandet, A. M.; Rivas, M.; Szefner, M.; Vergara, M. Proyecto Colaborativo Multicéntrico. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT). (Nómina completa de autores en SECyT). Enteropatógenos asociados a diarrea aguda infantil en Argentina. *Medicine*. 47:656. 1987.
- Binsztein, N.; Picandet, A. M.; Notario, R.; Patrino, E.; De Lesa, M. E.; De Petris, A.; Maurel, D.; Nader, O.; Rivas, M.; Szefner, M.; Vergara, M. Proyecto Colaborativo Multicéntrico. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT). (Nómina completa de autores en SECyT). Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Aeromonas* aisladas de niños diarreicos en siete centros de Argentina. *Rev. Lat-amer Microbiol* 41:121-126. 1999.
- Curso de Posgrado. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae*. Ministerio de Salud y Acción Social. Dirección Nacional de Medicina Sanitaria. Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán". 1992.
- Deschutter, J.; Villalba, V.; Quiroga, M.; Amer, L.; Gutiérrez, J.; Vergara, M. Identificación de enteropatógenos en diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones. *Revista de la Secretaria General de Ciencia y Tecnología*. 3(5): 50. 1987.
- Gupta, A.; Polyak, C. S. Laboratory confirmed Shigelosis in the United States, 1989-2002. Epidemiologic trends and patterns. *Clin Infect. Dis* 39:1-7. 2004.
- Husulak, E.; Oviedo, P.; Pegels, E.; Quiroga, M.; Vergara, M. Enteropatógenos bacterianos: Acción de rifampicina en concentraciones sub-letales sobre algunos factores asociados a la virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico. *Revista de Ciencia y Tecnología* Año 4, N°4a: 12-16. 2001.
- Nataro, J. P.; Koper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1):142-201. 1998.
- Notario, R. Enfermedades diarreicas infecciosas. UNR EDITORA. Colección Académica. Universidad Nacional de Rosario. 2006.
- Oviedo, P.; Quiroga, M.; Pegels, E.; Husulak, E.; Vergara, M. Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors. *J Chemother*, 12(6):487-490. 2000.
- Oviedo, P.; Vergara, M.; Rivas, M. Anticuerpos vibriocidas en Misiones, provincia libre de cólera. *Infect & Microbiol Clin* 12(1):18-22. 2000.

- Quiroga, M.; Lubaczewski, L.; Vergara, M. *Aeromonas* spp. en la enfermedad diarreica aguda: 10 años de estudio. *Ped Act* 1 (6):4-5. 1997.
- Quiroga, M.; Oviedo, P.; Chinen, I.; Pegels, E.; Husulak, E.; Binsztein, N.; Rivas, M.; Schiavoni, L.; Vergara, M. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina during the first twenty months of their lives. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 42(1):9-15. 2000.
- Quiroga, M.; Oviedo, P.; Pegels, E.; Husulak, E.; Jordá, G.; Ortíz, A.; Rüttler, M. E.; Vergara, M. *Escherichia coli* enteropatógena: influencia de concentraciones sub-inhedoras de ciprofloxacina sobre factores asociados a la virulencia. *Rev. de Ciencia y Tecnología CIDET. Año 7 /Número 7 a*: 28-36. 2005.
- Rivas, M.; Binsztein, N.; Basanta, G.; Vergara, M.; Quiroga, M.; Cinto, R.; Svennerholm, A. M. Antibody responses against *Escherichia coli* heat-labile toxin and colonization factor antigens I and II in argentinian children. *J Infect Dis* 171:1045-1049. 1995.
- Rivas, M.; Sosa-Estani, S.; Rangel, J.; Caletti, M. G.; Vallés, P.; Roldán, C. D.; Balbi, L.; Marsano de Molla, M. Cr.; Amoedo, D.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Hoekstra, R. M.; Mead, P.; Griffin, P. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children, Argentina. *EID* 14(5): 763-771. 2008.
- Rüttler, M. E.; Renna, N. F.; Balbi, L.; García, B.; Guidone, L.; Fernández, R.; Puig O.; Ortíz, A. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa aisladas de niños con diarrea aguda, en Mendoza, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 34: 167-170. 2002.
- Sociedad Chilena de Infectología-Comité de Microbiología Clínica, Instituto de Salud Pública-Laboratorio de Referencia de Bacteriología, Universidad de Chile-Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina. Síndrome diarreico agudo: Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico. *Rev chil infectol* 19(2):101-113. 2002.
- Vergara, M.; Deschutter, J.; Villalba, V.; Grenón, S.; Quiroga, M.; Pegels, E.; González, C. Primer aislamiento de *Campylobacter jejuni* en Misiones. Importancia de su estudio en pacientes con gastroenteritis severa. *Medicina Misiones III* (1):19. 1989.
- Vergara, M.; Eigner, T.; Grenón, S.; Quiroga, M.; Caffer, M. I.; Pegels, E.; Villalba, V. *Salmonella hadar*: primeros casos humanos en la República Argentina. *Infect Microbiol Clin* 1(3):45-46. 1989.
- Vergara, M.; Maestres Mesa, J.; Suárez Moreno, O., Monté Taboada, R. *Vibrio cholerae* toxigénico: identificación del gen *ctx B*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 15:181-185. 1997.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Deschutter, J.; Grenón, S.; Pegels, E.; González, C.; Britto, L.; Jordá, G.; Villalba, V.; Centeno, J.; López, O.; Chade, M. Identificación de enteropatógenos en la diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones. *Medicina Misiones II*(1):3. 1988.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Grenón, S.; Pegels, E.; Oviedo, P.; Deschutter, J.; Rivas, M.; Binsztein, N.; Claramount, R. Prospective study of enteropathogens in two communities of Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 38 (5):337-347. 1996.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Grenón, S.; Pegels, E. Enteropatógenos en la diarrea infantil de la ciudad de Posadas, Misiones. *Infect Microbiol Clin* 5:106-112. 1993.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Grenón, S.; Villalba, V.; Pegels, E.; Chade, M.; González, C.; Binsztein, N.; Eigner, T.; Depetris, A. Identificación de enteropatógenos en la

- diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones, República Argentina. Rev Lat-amer. Microbiol 34:71-75. 1992.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Grenón, S.; Villalba, V.; Pegels, E.; Husulak, E. Hallazgos bacteriológicos en infecciones pediátricas en Posadas, Misiones en el año 1988. Medicina Misiones IV (1):9. 1990.
 - Vergara, M.; Quiroga, M.; Pegels, E.; Husulak, E.; Oviedo, P.; Villalba, V. Miranda, A. M. Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. 2001.
 - Vergara, M.; Villalba, V.; Amer, L.; Centeno, J.; López, O.; Eigner, T.; Caffer, M. I. Primeros aislamientos de *Salmonella zaiman* en humanos. Rev Argent Microbiol 21(2): 89-91.1989.
 - Vergara, M. Capítulo 145. Diarrea Aguda: Mecanismos de Patogenicidad. Microbiología Biomédica. Editores Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Editorial Atlante S.R.L. pp.1157-1163. 1996.
 - Viboud, G. I.; Jouve, M. J.; Binsztein, N.; Vergara, M.; Rivas, M.; Quiroga, M.; Svennerholm, A. M. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinian children. J Clin Microbiol 37 (9):2829-2833. 1999.

GUÍA N° 7

Zoonosis: Brucelosis- Leptospirosis

LA BRUCELOSIS- EL LABORATORIO

Ante aislamientos sospechosos realizar inmediatamente el envío a laboratorios de referencia.

Los centros de referencia determinan, además, especie y biotipo (de trascendencia, por razones epidemiológicas).

La muestra enviada con mayor frecuencia al laboratorio, para la búsqueda de este microorganismo, es la sangre y su cultivo sigue siendo el método estándar, mejorando el rendimiento a través del proceso de lisis centrifugación.

Muestras extraídas de abscesos, médula ósea, biopsias de hígado, LCR, LPP, peritoneal, orina y otras muestras de tejidos infectados, son de utilidad.

Recordar que conviene macerar las muestras de tejidos en solución salina estéril, tamponada a pH 7.

Recordar que la muestra se mantiene a temperatura ambiente. Si la siembra no se realiza de inmediato, es necesario refrigerarla.

Se debe aconsejar, desde el laboratorio, la rápida obtención de suero del paciente en fase aguda, una vez iniciada la enfermedad.

Actualmente se dispone de métodos directos (diagnóstico bacteriológico y serológicos para detección de antígenos) y métodos indirectos que detectan anticuerpos, para el diagnóstico de brucelosis.

Métodos directos

Evidencian la presencia del germen o de sus componentes en tejidos de los animales o el hombre.

Diagnóstico bacteriológico

Examen directo

La observación previa de la muestra por coloración de Gram ofrece pocos resultados dado el reducido número de bacterias que se encuentran en la misma.

Pueden practicarse otras técnicas tintoriales, como coloración de Ziehl-Neelsen o coloración de Koster modificada, con similares resultados.

La técnica con anticuerpos fluorescentes, que emplea anticuerpos anti-*Brucella* marcados con fluoresceína, proporciona mejores resultados que la coloración de Gram. Aún así, presenta escasa sensibilidad y especificidad.

Microscopía

En la coloración de Gram se visualizan con morfología de cocobacilos o bastones gram-negativos.

Resisten la decoloración con ácidos débiles. No son bacterias ácido alcohol-resistentes pero se tiñen de rojo con la técnica de Ziehl-Neelsen.

Con la coloración Koster modificada, se colorean de rojo-naranja sobre fondo azul (*B. ovis* presenta color azul).

Cultivo

En la fase aguda, los hemocultivos hacen más factible el hallazgo del microorganismo, por lo que las muestras de sangre son de elección. A medida que se progresa hacia la cronicidad, disminuye la posibilidad de aislamiento bacteriológico.

Los hemocultivos se realizan de preferencia durante los picos febriles, obteniendo tres muestras en un período de 24 horas.

La muestra puede inocularse en frascos con 20 ml de medio líquido, adicionado con 2,5% de citrato de sodio e incubarse a 35°C en atmósfera con 5 a 10% de CO₂, realizando subcultivos a ciegas, en medio sólido, cada siete días.

Sin embargo, se dispone de metodologías que mejoran notablemente el rendimiento de los hemocultivos:

- **Técnica de Castañeda:** Se recomienda, dado que aumenta la sensibilidad de los hemocultivos. Utiliza una fase sólida y otra líquida en el mismo frasco, (medio bifásico).

Combina las ventajas que ofrece un medio líquido de enriquecimiento (que posibilita la proliferación del microorganismo) y un medio sólido, (que permite la caracterización morfológica del crecimiento).

El frasco se incuba durante las primeras 24 a 48 horas en posición vertical a 35°C. Luego de este tiempo, si no se observa desarrollo, se inclina de manera que el líquido impregne el medio sólido, tras lo cual se continúa incubando verticalmente.

En la fase sólida se observan las colonias de forma que recuerdan gotas de cera deslizando por una vela.

Si no se produjo desarrollo, el seguimiento de los cultivos se prolonga hasta los 60 días, a partir de los cuales se puede informar categóricamente como negativos los mismos.

- **Lisis-centrifugación:** La sangre inoculada se lisa por acción de detergentes y se concentra por centrifugación.

El sedimento se siembra en medio sólido.

No es difícil comprender el incremento en la sensibilidad, conociendo que *Brucella* es un parásito intracelular obligado, liberado al medio, durante la ruptura celular.

- **Métodos automatizados (VITAL, BACTEC, BACTEC/ALERT):** El BACTEC, evaluando en forma conjunta estos sistemas, ha resultado ser el más eficaz, detectando la presencia del microorganismo tras 3 a 5 días de incubación.

Presentan falsos negativos. En áreas endémicas, es conveniente realizar subcultivos a ciegas, de todos los hemocultivos de pacientes con sospecha de brucelosis.

Para muestras de diferente localización se prefieren medios de cultivo sólidos, que permiten la visualización de las colonias.

Los más recomendados son:

- Suero Dextrosa Agar (SDA): Permite el crecimiento de todas las especies.
 - Agar tripticasa soya más el agregado de suero equino o de conejo, en atmósfera de CO₂.
 - Se obtiene desarrollo de todas las especies.
 - Los medios nombrados no se utilizan generalmente para cultivos primarios, debido al desarrollo de bacterias de crecimiento rápido que dificultan la búsqueda.
- En estas situaciones, se prefieren medios selectivos, entre ellos:
- Thayer-Martin modificado.
 - Medio selectivo para *Brucella* (desarrollado por Kuzdas, Morse y Farrell): Composición: Agar infusión cardiaca, gelatina, glucosa, sangre ovina, actidiona, bacitracina, circlina y polimixina B.
 - Agar Brucella: Composición: tripteína, peptona de carne, glucosa, extracto de levadura, cloruro de sodio, bisulfito de sodio, agar.

Evaluación de los cultivos

Pueden informarse como negativos los cultivos sin desarrollo, luego de 45 días de incubación. Algunos autores sugieren que la misma debe prolongarse hasta los 60 días.

Morfología de las colonias

Son pequeñas, transparentes y brillantes con bordes definidos y superficie lisa. Visibles después del cuarto día en medios sólidos.

B. ovis y *B. canis* desarrollan como colonias rugosas, las otras se disocian a formas rugosas.

En el medio selectivo para *Brucella* las colonias son traslúcidas, aunque con el tiempo toman color miel.

En el medio de Thayer-Martin son blanquecinas y abombadas.

Identificación

- *Preliminar*: Radica en la investigación de las características morfológicas, bioquímicas y de aglutinación.

Las colonias sospechosas deben colorearse por técnica de Gram y repicarse en agar sangre y medios de fermentación de glucosa y lactosa.

Las colonias de cocobacilos gramnegativos no hemolíticos, no fermentadores de glucosa ni lactosa, oxidasa positivos y aerobios obligados, se enfrentan a reacciones de aglutinación con suero *Brucella* antiliso.

- **Definitiva y biotipificación**: Se utilizan las siguientes pruebas:
 - Producción de H₂S: Se evidencia colocando una tira de acetato de plomo suspendida sobre el cultivo de *Brucella*. La reacción positiva ennegrece la tira.
 - Requerimiento de CO₂ adicional para crecer: Se incuban las cepas en estudio en atmósfera aeróbica y con 5 a 10% de CO₂. Existen variantes que no precisan de CO₂ como suplemento.

- Aglutinación con suero monoespecífico: Se prepara una suspensión densa del germen en estudio en solución fisiológica y se mantiene a 65°C durante una hora. Se enfrenta en iguales proporciones con el antisuero.
- Producción de ureasa: Se utiliza el medio de urea de Christensen. La presencia de cepas productoras de ureasa se pone de manifiesto por el viraje al color rosa del medio.

Para algunas cepas, se precisa: Lisis por fagos (tipificación bacteriofágica) y pruebas metabólicas oxidativas.

Recordar que la manipulación de *Brucella* debe realizarse con los cuidados que requiere un microorganismo clasificado en el nivel de riesgo III.

- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Evidencian la presencia de antígenos de *Brucella* en distintos tejidos:

- ELISA
- Inmunofluorescencia directa
- Hemaglutinación reversa
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- **Métodos indirectos que detectan anticuerpos** (de uso en laboratorios de mediana complejidad).

Dado las dificultades para implementar la búsqueda de *Brucella* a partir de diferentes tejidos, en especial en la etapa crónica de la enfermedad, los métodos indirectos son de utilidad:

- Reacción de Huddleson
- Prueba de Rosa de Bengala
- Prueba en placa con Antígeno Tamponado (BPA)
- Aglutinación lenta en tubo de Wright
- Prueba con y sin 2-mercaptoetanol
- Fijación de complemento

Existen además modernas pruebas de unión primaria, de alta especificidad y sensibilidad:

- C-ELISA (ELISA de competición)
- Técnica de Polarización Fluorescente (FPA)

Cuando se recurre a este tipo de pruebas es necesario tener en cuenta las reacciones cruzadas y los anticuerpos que pueden encontrarse en cada etapa de la enfermedad.

En la etapa aguda, que se caracteriza por la presencia de anticuerpos aglutinantes, las inmunoglobulinas producidas son del tipo IgM e IgA, las que descienden paulatinamente hasta desaparecer, antes de los seis meses.

Las de tipo IgG, se mantendrán por un período mayor.

Estos anticuerpos completos dan positivas las pruebas de aglutinación en placa, de Wright y de fijación de complemento.

La prueba con y sin 2-mercaptoetanol permiten reconocer la evolución clínica de la infección, ya que este compuesto inactiva a las inmunoglobulinas del tipo IgM.

Las IgG, permiten seguir el curso de la infección, pero a medida que se avanza hacia la cronicidad, comienzan a producirse anticuerpos incompletos o no aglutinantes. Estos no son capaces de dar positivas las pruebas de aglutinación directa o activar al complemento.

Por lo tanto se debe recurrir a técnicas que reconozcan ambos anticuerpos, aglutinantes y no aglutinantes.

La Red Nacional de Brucelosis Humana de nuestro país, creada en el año 1994, dentro de la estructura de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. C. G. Malbrán” (ANLIS) y en conjunto con el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), describe y recomienda, **pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias**.

- Pruebas de tamizaje

Utilizan antígenos obtenidos a partir de cultivo en fase lisa de *Brucella abortus* y permiten la detección de anticuerpos anti *B. abortus*, *B. militensis* y *B. suis*.

Son pruebas rápidas y factibles, que se encuentran al alcance de laboratorios de rutina.

- Reacción de Huddleson: Reacción de aglutinación rápida en placa. El pH neutro del antígeno hace que esta prueba no sea la más recomendada, ya que puede favorecer la aglutinación de otros anticuerpos IgM, dando reacción cruzada con otros gérmenes.
- Prueba de Rosa de Bengala: Por su bajo pH, facilita la aglutinación de inmunoglobulinas de tipo IgG, disminuyendo la falta de especificidad.
- BPA (Antígeno bufferado en placa): De similares características que la anterior, ligeramente más sensible, usada en bancos de sangre.

- Pruebas confirmatorias:

Existen técnicas convencionales de bajo costo.

- Aglutinación lenta en tubo de Wright: La más antigua y utilizada. De baja especificidad. No recomendable en casos crónicos.
- Prueba con y sin 2-mercaptoetanol: Se utiliza en paralelo con la de Wright. La prueba con 2-mercaptoetanol, precipita los anticuerpos IgM, aumentando la especificidad, aunque disminuye las inmunoglobulinas del tipo IgG, restando sensibilidad.
- Fijación de complemento: De referencia a nivel internacional, con elevada especificidad y sensibilidad. Detecta IgG, predominante en casos crónicos. Muy tediosa y no aconsejable en casos agudos.

Recordar que en la actualidad existen pruebas confirmatorias, con elevada especificidad y sensibilidad, como:

- C-ELISA: Dispone de un anticuerpo monoclonal específico para un segmento de la cadena “O” del S-LPS de *Brucella*, que compite con los anticuerpos del paciente por el antígeno fijo en un soporte. Esta metodología se encuentra al alcance de laboratorios de mediana complejidad.
- FPA: Esta técnica requiere de un polarímetro para su lectura, siendo de difícil implementación en los laboratorios de rutina.

Recordar que cuando se sospecha de infección por *B. canis* se utilizan antígenos de la cepa *B. canis* M, para hacer diagnóstico. Como tamiz se realiza una prueba de microaglutinación lenta en tubo (RSAT) y un ELISA como confirmatoria.

LEPTOSPIROSIS- EL LABORATORIO

Dado que el periodo de incubación es de entre 1 y 2 semanas, se debe prestar especial atención a las 1 o 2 semanas previas a la manifestación de los primeros síntomas, detectando factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

Para el diagnóstico temprano de la enfermedad los test específicos de laboratorio son poco sensibles.

En este momento la enfermedad se sospecha a partir de los signos y síntomas presentes, la historia epidemiológica y los datos de laboratorio inespecíficos.

Para el diagnóstico definitivo los test específicos son fundamentales.

Todos los casos sospechosos de leptospirosis deben ser confirmados mediante los **TEST ESPECÍFICOS DE LABORATORIO**.

• LABORATORIO ESPECÍFICO

Se debe tener muy presente el periodo evolutivo en que se encuentra la enfermedad para obtener la muestra correcta.

• TOMA DE MUESTRA PARA EL DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LEPTOSPIROSIS (GRÁFICO AL PIE DE PÁGINA)

Aislamiento

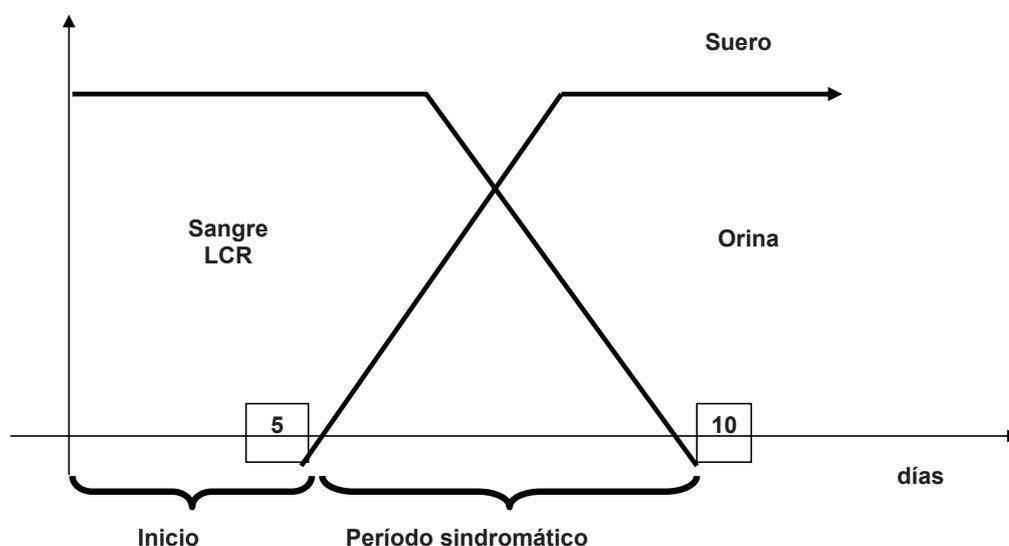
El aislamiento del agente causal es fundamental para definir un diagnóstico y conocer la distribución de esta zoonosis en el medio.

- Aislamiento previa inoculación en animales de experimentación

Cuando el material no está contaminado, la siembra directa puede dar el mismo resultado que la inoculación, pero si el material no se encuentra en condiciones óptimas para su cultivo, la inoculación ofrecerá mayores ventajas.

Un método alternativo consiste en el empleo de filtros de membrana de 0,45 μm que permite el paso selectivo de las leptospiras.

Los hamsters son los animales más usados, por ser susceptibles a un gran número de serovares.



Las muestras biológicas estudiadas son las mismas que las empleadas para el cultivo directo (sangre, orina, tejidos autopsiados, y otros).

- Aislamiento primario por cultivo directo

- Sangre, orina o tejido.
- Otras muestras clínicas: LCR, líquido amniótico y fluidos peritoneales.

En medicina humana, sangre, orina y LCR son las muestras habituales.

La selección de la muestra depende de la fase evolutiva en que se encuentre el individuo.

Las leptospiras pueden ser aisladas de sangre o LCR durante la fase aguda o de invasión (primeros 7 días de la enfermedad) y a partir de los 10 a 14 días pueden ser recuperadas de la orina.

En el caso de los tejidos, el órgano de elección es el riñón, pudiendo ser cultivados también hígado o cerebro.

El material remitido al laboratorio es de gran importancia ya que las leptospiras son microorganismos de difícil aislamiento y las condiciones para su desarrollo son muy exigentes. Un resultado negativo no es indicativo de la ausencia de leptospiras en la muestra. Por tal motivo para la obtención de las muestras para aislamiento deben ser tenidas en cuenta algunas consideraciones:

- la obtención de la muestra debe ser en forma previa a la administración de antibióticos.
- en el caso de muestra de sangre: tomar sangre venosa con jeringa y aguja estéril.
- la orina debe recogerse en condiciones de esterilidad despreciando la primera parte de la orina y recogiendo la segunda, efectuar inmediatamente el cultivo. Si ello no fuera posible tratar las muestras con solución salina estéril amortiguada con fosfatos (SAF) para controlar la acidez y mantenerla a temperatura ambiente.
- NO CONGELAR LAS MUESTRAS.

Medios de cultivo empleados

El de consenso general es el medio de Ellinghausen, McCulough, Johnson y Harris (EMJH), que por sus características intrínsecas es el medio de elección. Sin embargo no es accesible a todos los laboratorios, por lo que podrían ser usados como medios alternativos: Stuart, Korthof y Fletcher.

- Para el cultivo de leptospiras aplicables a los test serológicos se emplean medios líquidos.
- Para el aislamiento de cepas y mantenimiento de los cultivos stock, medios semisólidos, pudiendo ser el mismo medio en ambos casos (generalmente el EMJH).

Como inhibidores de la contaminación accidental pueden utilizarse agentes químicos: 5 fluoracilo (5Fu), neomicina, sulfatiazol, cicloheximida, ácido nalidixico o furazolidona. El empleo de 5Fu ha sido aceptado para su uso general.

Para la siembra del cultivo es conveniente hacer diluciones del material. ¿Qué cantidad sembrar?

- Orina: 0,5 ml de cada dilución (se recomienda la siembra por duplicado, con medio con y sin el agregado de agentes químicos inhibidores de la contaminación, ya que estos pueden inhibir también el desarrollo de las leptospiras).
- LCR: 0,5 ml siembra directa.

- Sangre: 2 a 3 gotas. Si no se puede inocular inmediatamente, colocar la sangre en un tubo estéril con 15 o 20 µl de heparina. Mantener a temperatura del laboratorio hasta que se realice el cultivo.

Los cultivos deben ser incubados entre 28 a 30°C y la observación microscópica debe hacerse semanalmente, no descartando como negativo hasta las 24 semanas.

Las cepas aisladas son tipificadas en laboratorios especializados.

• TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Dada la dificultad para la recuperación de la bacteria, lo que depende del período de la enfermedad, el diagnóstico de laboratorio se realiza, frecuentemente, demostrando la presencia de anticuerpos antileptospiras en suero. El tipo de anticuerpos detectables en el curso de la infección depende de la técnica serológica utilizada.

Técnica de “screening” (género específica)

En nuestro país la técnica de screening de uso más frecuente es la **AGLUTINACIÓN MACROSCÓPICA CON ANTIGENOS TERMORRESISTENTES (TR)**.

Es una técnica económica, rápida y muy confiable, con gran concordancia con la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).

El antígeno, sumamente estable, se obtiene a partir de un cultivo de cualquier serovar de *L. interrogans* o *L. biflexa* sometida a procedimientos térmicos.

• METODOLOGÍA

- En una placa de vidrio depositar volúmenes iguales (25 µl) del antígeno TR y del suero problema.
- Mezclar bien utilizando un palillo de madera y rotando la placa.
- Observar aglutinación dentro de los cuatro minutos, desde escasos grumos hasta abundantes aglutinaciones bien visibles, con aclaramiento de la solución suero-TR.

Otra técnica de escasa aplicación en el país, pero de amplia difusión en el resto del mundo es el **ELISA con las siguientes ventajas:**

- Automatizable
- Alta sensibilidad
- Antígeno muy estable
- Fácil implementación en el laboratorio
- Fácil interpretación (no subjetiva)

Los resultados positivos obtenidos por estas técnicas deben ser confirmados por la técnica de referencia: la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).

- Técnica confirmatoria (serovar específica): Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).

Es el procedimiento de referencia internacional para la determinación de la cinética de anticuerpos.

Se emplea para detectar anticuerpos antileptospira en el suero, identificar aislamientos de leptospiras y clasificar cepas, además de servir como base para evaluar cualquier otro método serológico nuevo para diagnóstico de la enfermedad.

Se deben realizar muestras de suero pareadas para evaluar la seroconversión que es confirmatoria de enfermedad aguda.

Metodología

- Enfrentar diluciones del suero del paciente con los diferentes serovares de leptospiras prevalentes en la región
- Incubar y leer la aglutinación microscópica con cada una de las cepas en el microscopio de campo oscuro.

Es muy frecuente observar que los anticuerpos aglutinantes reaccionen con más de una serovariedad de leptospira, a títulos similares, lo cual no permite determinar la serovariedad de leptospira involucrada.

Este fenómeno de co-aglutinación está generalmente presente durante el período agudo de la enfermedad.

Ventajas:

- Los resultados son comparables universalmente.
- Permite determinar la cinética de anticuerpos.
- En algunos casos permite estimar la serovariedad causal por lo que brinda mayor información para estudios epidemiológicos y de investigación.

Desventajas:

- Alto costo
- Antígeno menos estables (contaminación- autoaglutinación)
- Requiere un mantenimiento constante de los antígenos
- Requiere personal capacitado en montaje, lectura e interpretación de los resultados
- Menor sensibilidad

Se deben utilizar muestras de suero pareadas, la segunda muestra de suero se debe obtener a los 7 a 10 días de la primera, para poder determinar seroconversión.

Nota: todas las muestras deben ir acompañadas de una ficha clínico epidemiológica del paciente.

DEMOSTRACIÓN DIRECTA DE LEPTOSPIRAS**• OBSERVACIÓN PREVIA COLORACIÓN**

Numerosas técnicas de coloración han sido propuestas: Giemsa o Rojo Congo, Levaditi, Young o Fontana Tribondeau.

Los resultados son variables, por la relativa dificultad de adherencia de las leptospiras al porta objeto, y por el escaso número de bacterias en algunas muestras.

La aplicación de estas técnicas debe completarse con el aislamiento.

OBSERVACIÓN DIRECTA EN CAMPO OSCURO

El uso del microscopio de campo oscuro para detectar la presencia de leptospiras en fluidos o tejidos puede permitir un rápido diagnóstico. Pero la concentración de microorganismos puede ser muy baja como para detectar las leptospiras.

Por esta razón, no es conveniente usarlo como única técnica, sino como complemento de otras.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Ariza, J. Diagnóstico de la brucelosis en la actualidad. *Med Clin (Barc)* 98:494-496.1992.
- Braselli, A. Leptospirosis www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm
- Castro, H. A.; González, S. R.; Prat, M. I. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 39(2):203-216. 2005.
- Lucero, N. E. Red Nacional de Brucelosis Humana. INEI-ANLIS Dr. C. G. Malbrán, Argentina - Area Técnica. Asociación Argentina de Microbiología- Boletín N° 177- julio-sep 2007.
- Nieto, H. A. Boletín de temas de salud de la Asociación de Médicos Municipales de la Ciudad de Buenos Aires. Año 8 N° 67 Mayo 2001.
- Pappas, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M.; Tsianos, E. *Brucellosis*. *N Engl J Med* 352(22):2325-2336. 2005.
- Rodríguez Zapata, M.; Solera Santos, J.; Sánchez Martínez, L.; Álvarez-Mon Soto, M. Brucelosis. Aspectos patogénicos. Clínica, diagnóstico y tratamiento. Formas específicas de enfermedad. *Medicine* 7(79): 3651-3658. 1998.
- Seijo, A. Comisión Científica sobre leptospirosis de la República Argentina. Manual de leptospirosis. Buenos Aires 1994. 1° Congreso Argentino y 1° Congreso Latinoamericano de zoonosis. Buenos Aires. 1995.
- Soloaga, R.; Salinas, A.; Poterallo, M.; Margari, A.; Suar, B.; Lucero, N.; Turcos, M.; Procopio, A.; Almuzara, M. Bacteriemia por *Brucella canis*. Aislamiento con el sistema Bact-Alert. *Rev Argent Microbiol* 36:81-84. 2004.
- Yagupsky, P. Use of the BACTEC MYCO/F LYTIC Medium for detection of *Brucella militensis* bacteriemia. *J Clin Microbiol* 42(5): 2207-2208. 2004.

ANEXO 1

Abordaje para iniciar el estudio de la tipificación bacteriana: Esquemas, tablas y pruebas de identificación mínimas

Las especies bacterianas son grupos de cepas con características en común.

Se estudian sus caracteres fenotípicos que se extraen de la morfología (tamaño, aspecto, disposición, inclusiones, esporas, cápsulas, flagelos, tipos de tinción), sus características culturales (morfología de las colonias, márgenes, elevación, textura, opacidad, pigmentación), propiedades bioquímicas, necesidades nutricionales, pruebas serológicas, entre otras.

La clave para identificar las bacterias depende del aislamiento en cultivo puro. Las pruebas de identificación se deben realizar siempre en colonias únicas o cultivos puros.

Es posible obtener una identificación preliminar o presuntiva de muchas bacterias de importancia clínica, en base a pocas características de las células.

Para ello, es necesario el conocimiento de:

- las características ambientales de su crecimiento óptimo (aerobias, anaerobias, microaerófilas, tiempo de cultivo, humedad, temperatura de crecimiento);
- estudio del aspecto colonial (punto fundamental en el diagnóstico bacteriano) como morfología, tamaño, color, olor, tipo de superficie, consistencia, crecimiento en sábana;
- comportamiento frente a diferentes sustratos incorporados al medio de cultivo (hemólisis, fermentación de azúcares, utilización de sales, comportamiento frente a los colorantes);
- comportamiento metabólico como la utilización de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas con la producción de sustancias detectables, por reacciones directas o indirectas.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas bioquímicas y otras la identificación puede realizarse en forma convencional, mediante diagramas de flujo ramificados (esquemas) o matriz de cuadrículas (tablas).

Para facilitar la identificación bacteriana se han desarrollado códigos numéricos aplicados a los resultados de las pruebas, tanto por medios manuales como computarizados, los que trasladan las características de la identificación a una secuencia de números. Ejemplo de este sistema es el sistema de galería API.

Existen también en el mercado varios sistemas de identificación automatizados, cuya ventaja es la facilidad de aplicación, la rapidez en dar una identificación definitiva y de poder realizar, simultáneamente, las pruebas de sensibilidad (Vitek y el Microscan, entre otros).

Todas las pruebas bioquímicas poseen requisitos para su lectura: atmósfera de incubación, tiempo de incubación, reactivos a utilizar, los cuales deben ser seguidos estrictamente, a fin de asegurarnos una correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Es conveniente recordar que son pocas las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana que representan el comportamiento del 100% de las cepas de una misma especie (100% de certeza). Siempre existe la posibilidad de encontrar un aislamiento con comportamiento atípico en su perfil bioquímico.

Sin embargo, es necesario tratar de identificar los aislamientos obtenidos, lo más certeramente posible, ya que tiene importancia tanto clínica como epidemiológica, siendo fundamental en el laboratorio para la lectura e interpretación de los halos de inhibición de las pruebas de sensibilidad con discos de antibióticos.

Es de importancia considerar que:

- La identificación de la especie bacteriana permite seleccionar los antimicrobianos a ensayar, ya que no se debe ensayar ni informar un antimicrobiano frente a una especie que es naturalmente resistente al mismo.
- Los antimicrobianos que se ensayan no son los mismos en una enterobacteria, un bacilo gramnegativo no fermentador (BNF), un estafilococo o un enterococo.
- Tanto la lectura de los halos de inhibición para un mismo antimicrobiano, como la sensibilidad a un determinado antimicrobiano, pueden variar dentro del género.

En la actualidad existen en el mercado medios cromogénicos, los que permiten orientarnos en la identificación de los microorganismos involucrados en el proceso infeccioso y disminuir el número de pruebas bioquímicas necesarias para la identificación.

ENTEROBACTERIAS

Los bacilos gramnegativos que no forman esporas, incluidos en la familia *Enterobacteriaceae*, se caracterizan por crecer con facilidad en medios ordinarios, tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

La mayoría crece en medios sintéticos simples y pueden utilizar una única fuente de carbono.

La glucosa es utilizada por ellos de manera fermentativa, con formación de ácidos y gases, reduciendo los nitratos a nitritos y dando una reacción negativa frente a la oxidasa.

Los diferentes géneros y especies de este grupo pueden ser identificados a partir de su capacidad para fermentar hidratos de carbono específicos, para utilizar ciertos sustratos (por ejemplo el citrato) como única fuente de carbono, y por dar lugar a productos finales característicos (por ejemplo el indol a partir del triptófano, amoníaco a partir de la urea y sulfuro de hidrógeno).

Es conveniente iniciar el estudio con una serie de pruebas preliminares que permitirán ubicar el género de las enterobacterias más frecuentes en infecciones humanas, para luego proseguir con otras pruebas bioquímicas a fin de identificar la especie.

Pruebas mínimas de identificación de enterobacterias más frecuentes en clínica

| Género | TSI | Gas | SH ₂ | RM | VP | I | Cit | FA | Urea | Mov | Lis | Arg | Orn |
|---------------------|------------|-----|-----------------|----|----|---|-----|----|------|-----|-----|-----|-----|
| <i>Escherichia</i> | A/A | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | v | v |
| <i>Shigella</i> | K/A | - | - | + | - | v | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>Salmonella</i> | K/A | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | v | + |
| <i>Citrobacter</i> | A/A K/A | + | v | + | - | v | + | - | v | + | - | v | v |
| <i>Klebsiella</i> | A/A | ++ | - | - | + | v | + | - | + | - | + | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | A/A | ++ | - | - | + | - | + | - | v | + | - | + | + |
| <i>Serratia</i> | K/A | + | - | v | + | - | + | - | - | + | + | - | + |
| <i>Proteus</i> | K/A | v | + | + | v | v | V | + | ++ | + | - | - | + |
| <i>Morganella</i> | K/A | + | - | + | - | + | - | + | ++ | + | - | - | + |
| <i>Providencia</i> | K/A | v | - | + | - | + | + | + | v | v | - | - | - |
| <i>Yersinia</i> | K/A | - | - | + | - | v | - | - | v | -* | - | - | + |

TSI: Agar Hierro Triple Azúcar, RM: Rojo de Metilo, VP: Voges-Proskauer, I: Indol, Cit: Citrato, FA: Fenilalanina, Mov: Movilidad, Lis: Lisina, Arg: Arginina, Orn: Ornitina, A: Acido, K: Alcalina, +: 90% o más positivas, -: 90% o más negativas, v: variable. Las zonas sombreadas indican las reacciones claves. * No móviles a 35°-37°C, móviles a 22°C. (Esquema adaptado de Koneman, Allen, Janda, Schreckenber, Winn. Diagnostic Microbiology. 5th ed. Ed. Lippincott. 1997).

El laboratorista debe adaptar su esquema de tipificación de acuerdo a sus necesidades y posibilidades, tratando de que sea lo más completo posible a fin de asegurar una correcta identificación.

Para ello, es conveniente adaptar las tablas propuestas en la bibliografía a esquemas más simples de trabajo y que involucren pruebas que sean accesibles, fáciles de realizar e interpretar, y de menor costo.

Para realizar dichos esquemas recomendamos siempre iniciar el estudio de bacilos gram negativos con dos pruebas básicas: el TSI y la oxidasa, que nos permiten separarlos en grandes grupos.

Por ejemplo:

| | | |
|--------------------------------------|------------------|---|
| TSI fermentador de glucosa | Oxidasa negativa | probable enterobacteria |
| TSI fermentador de glucosa | Oxidasa positiva | no es una enterobacteria: ¿ <i>Vibrio</i> ?, ¿ <i>Aeromonas</i> ?, ¿ otros ? |
| TSI no fermentador de glucosa | Oxidasa positiva | Bacilo no fermentador (BNF): ¿ <i>Pseudomonas</i> ?, ¿ otros ? |
| TSI no fermentador de glucosa | Oxidasa negativa | BNF: ¿ <i>Acinetobacter</i> ?, ¿ otros ? |

A partir de esa información preliminar se puede ingresar en las tablas para realizar los esquemas desde cualquier prueba bioquímica.

Supongamos que estamos frente a una probable enterobacteria:

Prueba de la fenilalanina: entre las enterobacterias más frecuentes en clínica, solo los microorganismos del género *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* la producen, por lo que una simple prueba (que de realizarse con un alto inóculo puede ser leída luego de 6 hs de incubación) nos permite ubicarnos dentro de un probable género.

Por ejemplo:

Diferenciación bioquímica entre *Escherichia coli* lactosa positiva tardía y *Morganella morganii*

| Microorganismo | TSI | IMViC | LDC | Fenilalanina |
|--------------------|----------------|---------|----------|--------------|
| <i>E. coli</i> | Alcalino/Ácido | + + - - | variable | - |
| <i>M. morganii</i> | Gas (+) | + + - - | - | + |

IMViC: Indol- Rojo de Metilo-Voges Proskauer- Citrato, LDC: Lisina decarboxilasa

O **prueba del Voges-Proskauer**: entre las enterobacterias más frecuentes en clínica, el grupo KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) son capaces de producir acetilmetilcarbinol a partir de la glucosa (resultado positivo), mientras que otras enterobacterias no lo hacen.

Por ejemplo:

Diferenciación bioquímica entre *Escherichia coli*, y distintas especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*.

| Microorganismo | TSI | IMViC | LDC | ODC | ADH | Movilidad |
|-------------------------------|----------------|---------|-----|----------|----------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | Ácido/Ácido | | | | | |
| | Gas (+) | + + - - | + | variable | variable | + |
| <i>K. pneumoniae</i> | Ácido/Ácido | | | | | |
| | Gas (+) | - - + + | + | - | - | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Ácido/Ácido | | | | | |
| | Gas (+) | - - + + | - | + | + | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Ácido/Ácido | | | | | |
| | Gas (+) | - - + + | + | + | - | + |
| <i>Serratia marcescens</i> | Alcalino/Ácido | | | | | |
| | Sin gas | - - + + | + | + | - | + |

IMViC: Indol- Rojo de Metilo-Voges Proskauer- Citrato, LDC: Lisina decarboxilasa, ODC: Ornitina decarboxilasa, ADH: Arginina dehidrolasa

O el **ensayo de movilidad**: entre las enterobacterias más frecuentes en clínica, solo *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* inactivo (lactosa negativa) y *Shigella* spp. son inmóviles. De encontrarnos frente a esta situación, la reacción del Voges Proskauer y la fermentación de la lactosa (TSI) nos permite separar *Klebsiella* spp. de las otras dos, mientras que la prueba de la utilización de acetato nos separa *Escherichia coli* inactivo (acetato positivo) de *Shigella* spp (acetato negativo).

Por ejemplo:

Diferenciación bioquímica entre *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* inactivo y *Shigella* spp.

| Microorganismo | TSI | IMViC | LDC | Acetato |
|----------------------------------|----------------|---------|----------|----------|
| <i>Klebsiella</i> spp. | Ácido/Ácido | v - + + | + | variable |
| | Gas (+) | | | |
| <i>Escherichia coli</i> inactivo | Alcalino/Ácido | + + - - | variable | variable |
| | Sin gas | | | |
| <i>Shigella</i> spp. | Alcalino/Ácido | v + - - | - | - |
| | Sin gas | | | |

IMViC: Indol- Rojo de Metilo-Voges Proskauer- Citrato, LDC: Lisina decarboxilasa, v:variable

O la *producción de SH₂*: característico de algunas especies de *Proteus*, *Citrobacter* y *Salmonella*. Un TSI donde se observe fermentación de glucosa y lactosa (ácido/ácido) y producción de SH₂, es más probable que corresponda a *Citrobacter freundii* que a *Escherichia coli*.

Proteus spp. puede diferenciarse fácilmente de *Salmonella* spp. con la prueba de la fenilalanina, que como hemos dicho anteriormente, un resultado positivo es característico de *Proteus* spp.

Por ejemplo:

Diferenciación bioquímica de las enterobacterias productoras de sulfuro de hidrógeno más frecuentes en clínica

| Microorganismo | TSI | IMViC | Fenilalanina | Ureasa |
|-----------------------------------|---|---------|--------------|----------|
| <i>Proteus</i> spp. | Alcalino fondo negro con gas | v + - v | + | + |
| <i>Salmonella</i> spp. (no thypi) | Alcalino fondo negro con gas | - + - + | - | - |
| <i>Citrobacter</i> spp. | Ácido o Alcalino fondo negro con gas | v + - v | - | variable |

IMViC: Indol- Rojo de Metilo-Voges Proskauer- Citrato, v: variable

En resumen, pocas pruebas bien seleccionadas nos permiten llegar a una identificación presuntiva lo más correcta posible.

BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES (BNF):

El término “no fermentadores” está referido a un grupo de bacilos gramnegativos aerobios, no esporulados, que son incapaces de utilizar hidratos de carbono como fuente de energía, o que los degradan por la vía oxidativa más bien que por la vía fermentativa, lo que los diferencia de las enterobacterias.

● ESQUEMA ORIENTADOR PARA BNF MÁS FRECUENTES EN CLÍNICA

La caracterización preliminar de las cepas se realiza registrando:

a. Características coloniales:

- Morfología colonial
- Olor

Pseudomonas aeruginosa

Frutal

Stenotrophomonas maltophilia

amoniacal en agar sangre

-Observación de Pigmento

| | |
|---------------|---|
| Amarillo | <i>Burkholderia cepacia</i> (difusible) <i>S. maltophilia</i> (no difusible) <i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. |
| Marrón/ Ocre | <i>S. maltophilia</i> (no difusible) <i>P. stutzeri</i> |
| Verde | <i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>S. maltophilia</i> (débil) |
| Rojo | <i>P. aeruginosa</i> <i>S. maltophilia</i> (débil) |
| No pigmentado | <i>Acinetobacter</i> spp. |

-Presencia de Hemólisis

| | |
|----------------|--|
| β-hemólisis | <i>P. aeruginosa</i> |
| No hemolíticas | <i>Acinetobacter</i> spp. <i>S. maltophilia</i> |

b. Coloración de Gram

| | |
|---------------------------|--|
| Bacilos Gram negativos | <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> <i>S. maltophilia</i> |
| Diplococos Gram negativos | <i>Acinetobacter</i> spp. |

c. Pruebas bioquímicas mínimas:

- Agar hierro triple azúcar (TSI)
- Prueba de la oxidasa
- Movilidad: en caldo o medio de movilidad nitrato (MN)
- Oxidación de lactosa (10%)
- Descarboxilación de aminoácidos según Moeller.
- Producción de desoxirribonucleasa (DNAsa)
- Sensibilidad o resistencia a polimixina B
- Sensibilidad o resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS)

● IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE BNF AISLADOS EN CLÍNICA

Sistema relativamente breve para ser desarrollado en el laboratorio clínico, permite la identificación de BNF más frecuentemente aislados dentro de las 24-48 hs.

Es accesible al laboratorio clínico pequeño, el tiempo es esencial, el número de pruebas es restringido al mínimo y se enfocan aquellos caracteres más discriminatorios.

Primeros indicios para el reconocimiento de BNF:

- 1- TSI: pico, buen desarrollo, alcalino
Punción, no acidificación, neutro

- o sea, TSI alcalino/neutro (K/N), típico de BNF.
- 2- Gram del TSI: ver si son bacilos gramnegativos o diplococos gramnegativos.
- 3- Oxidasa: toda colonia formada por bacterias gramnegativas desarrolladas en agar sangre u otro medio de aislamiento primario, que es oxidada positiva, debe considerarse presuntamente como perteneciente al grupo BNF.

No todos los BNF son oxidasa positiva, sin embargo, la demostración de esta característica excluye al microorganismo del grupo de las enterobacterias.

Análisis de rasgos:

a) Oxidasa: un marcador muy importante para la identificación de BNF es la oxidasa.

Oxidasa positiva (+)

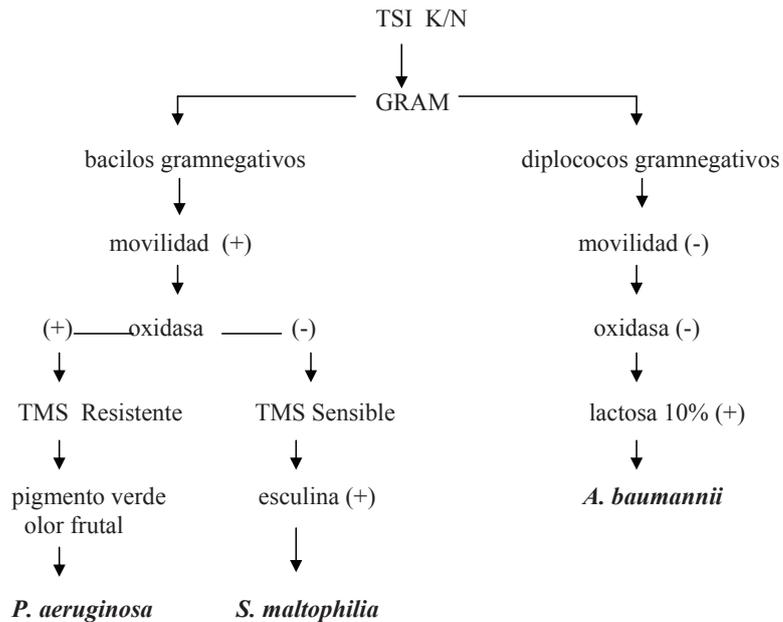
- P. aeruginosa*
- Pseudomonas* spp.
- Burkholderia cepacia*
- Chryseobacterium* spp.
- Flavobacterium* spp.

Oxidasa negativa (-)*

- Acinetobacter* spp.
- S. maltophilia*
- Burkholderia cepacia***
- Alcaligenes* spp.

* Solo pocas especies de BNF son oxidasa negativa (-); y solo dos de ellas son comunes: *A. baumannii* y *S. maltophilia*. **El 7-10% de las cepas pueden ser oxidasa negativa.

Pruebas mínimas de identificación de BNF más frecuentes en clínica



K/N: Alcalino/neuto, TMS: trimetroprima-sulfametoxazol

b) Movilidad

Móviles:

Pseudomonas (mayoría de las especies)
Stenotrophomonas
Alcaligenes spp.

Inmóviles:

Acinetobacter spp.
Chryseobacterium spp.
Flavobacterium spp.

c) Lactosa al 10%: rasgo útil para caracterizar BNF oxidasa (-)

A. baumannii : oxidasa (-)
 lactosa (+)
 diplococos Gram (-)

Lactosa al 10%**Positiva**

B. cepacia
Pseudomonas spp.
A. baumannii

Negativa

S. maltophilia
Alcaligenes spp.

Son 3 marcadores, y uno de ellos es el microscópico.

En BNF oxidasa (+), pocas especies son lactosa (+) fuerte.

d) Lisina decarboxilasa (LDC)

BNF oxidasa (-): rasgo útil para *S. maltophilia* LDC (+)

BNF oxidasa (+): sólo para *B. cepacia* LDC (+)

Para la identificación de BNF, ELEGIR SIEMPRE POCOS MARCADORES.

Entre dichos marcadores se encuentran no solo las pruebas bioquímicas antes mencionadas, sino también antibióticos que se utilizan no solo con dicho fin sino también en la terapéutica.

En BNF son de importancia: la sensibilidad a la polimixina B y la sensibilidad a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS).

| Microorganismo | Susceptibilidad a: | |
|-----------------------------|--------------------|------------|
| | Polimixina B | TMS |
| <i>B. cepacia</i> | RESISTENTE | SENSIBLE |
| <i>S. maltophilia</i> | RESISTENTE | VARIABLE |
| <i>A. baumannii</i> | SENSIBLE | VARIABLE |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | SENSIBLE | RESISTENTE |
| <i>Chryseobacterium</i> spp | RESISTENTE | RESISTENTE |
| <i>Flavobacterium</i> spp. | RESISTENTE | RESISTENTE |

Idénticas recomendaciones que vimos en enterobacterias:

- es necesario identificar los aislamientos obtenidos con la mayor certeza posible, así como ser cuidadosos al seleccionar los antimicrobianos a ensayar e informar, por la importancia clínica y epidemiológica de las infecciones estudiadas.

BACILOS GRAMNEGATIVOS, FERMENTADORES, OXIDASA POSITIVA**• DIFERENCIACIÓN ENTRE *VIBRIO CHOLERAE* Y OTROS MICROORGANISMOS RELACIONADOS**

| Organismos | TSI Gas | SH ₂ | Oxidasa | LDC | Esculina | ODC | Indol | CINa 0% ^a | O129 ^b |
|-----------------------------------|------------|-----------------|----------------|-----|----------|----------------|-------|----------------------|-------------------|
| <i>Vibrio cholerae</i> | - | - | + | + | - | + | + | + ^c | S |
| <i>Vibrio</i> spp. | v | - | + ^d | v | v | v | V | - | v |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | v | - | + | + | + | - | + | + | R |
| <i>Aeromonas</i> spp | v | - | + | v | v | - ^e | V | + | R |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i> | - | - | + | + | - | + | + | + | S |
| <i>Chryseobacterium violaceum</i> | - | - | + | - | - | - | - | - | ND |

LDC: Lisina decarboxilasa, ODC: Ornitina decarboxilasa, (+) positivo, (-) negativo, v: variable, S: sensible, R: resistente, ND: no determinado, Vibriostático O/129: derivado fosfato de 2,4 diamino-6,7 diisopropil-pteridina.

^a Desarrollo en caldo nutritivo sin CINa.

^b Sensibilidad al vibriostático O129 (150 µg).

^c *V. mimicus* también da un resultado positivo. ^d *V. metschnikovii* es oxidasa negativo.

^e *A. veronii biov. veronii* es ornitina positiva.

• REACCIONES DE *VIBRIO CHOLERAE* EN PRUEBAS DE PESQUISAJE

| Prueba de pesquisaje | Reacciones de <i>Vibrio cholerae</i> |
|---------------------------------|---|
| Prueba de oxidasa | Positivo |
| Prueba de la cuerda | Positivo |
| Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) | A/A (pico amarillo /fondo amarillo), no produce gas, no SH ₂ (18-24 horas) |
| Agar Hierro Lisina (LIA) | K/K (pico violeta /fondo violeta), no produce gas, no SH ₂ (18-24 horas) |
| Coloración de Gram | Pequeños bacilos curvos gramnegativos |
| Montaje húmedo | Pequeños bacilos curvos con movilidad rápida |

(Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).

Haemophilus spp.:Identificación de especies de *Haemophilus* según sus requerimientos de crecimiento

| Especie | Requerimientos de factor X y V | | β-hemólisis en sangre de conejo |
|----------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| | X | V | |
| <i>H. influenzae</i> | + | + | - |
| <i>H. parainfluenzae</i> | - | + | - |
| <i>H. haemolyticus</i> | + | + | + |
| <i>H. parahaemolyticus</i> | - | + | + |
| <i>H. aphrophilus</i> | + | - | - |
| <i>H. paraphrophilus</i> * | - | + | - |

**H. paraphrophilus* es negativo a ornitina, mientras que *H. parainfluenzae* es positivo a ornitina

Reacciones bioquímicas: Para efectuarlas, agregar a los medios de cultivo clásicos de cada reacción, gotas de factores X y V para su crecimiento.

a- **Para diferenciación de especies:**

- Requerimiento de factores X y V.
- Presencia de hemolisinas (β-hemólisis): ausentes en *H. influenzae*.
- Fermentación sin gas de: glucosa, sacarosa y lactosa.
- Producción de catalasa.
- Acrecentamiento del desarrollo en presencia de CO₂.

b- **Para diferenciación de biotipos:**

- Producción de indol
- Producción de ureasa
- Producción de ornitina decarboxilasa

Estas tres reacciones tienen la ventaja que no requieren factores de crecimiento, por lo que no es necesario agregarlos a los medio de prueba. Los tres medios de prueba (cantidad de 0,5 ml) se inoculan densamente y se leen a las 4 hs. de incubación. La prueba de la ornitina puede requerir, en algunos casos, 18 a 24 hs. de incubación adicional.

BACILOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS FACULTATIVOS● **ALGUNAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, CULTURALES Y BIOQUÍMICAS ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes***

Características morfológicas

(coloración de Gram)

Pleomórficos, cocobacilos grampositivos o cocos grampositivos en cadenas cortas

Características culturales

En agar sangre colonias circulares, translúcidas, β-hemolíticas.

Temperatura óptima de desarrollo: 37°C

Pueden desarrollar en un amplio rango de temperaturas (2,5°C a 37°C)

Características bioquímicas:

| | |
|-------------------------|---------------|
| Hemólisis | Beta (gamma)* |
| Test de CAMP | Positivo (+) |
| Catalasa | Positiva (+) |
| Bilis –esculina | Positiva (+) |
| Movilidad (SIM) a 22°C | Positiva (+) |
| Desarrollo a 4°C | Positivo (+) |
| Desarrollo en CINA 6,5% | Positivo (+) |
| Hidrólisis de Hipurato | Positivo (+) |
| Voges-Proskauer | Positivo (+) |

*Se realiza en medio agar sangre (5%) y se incuba en jarra con vela. Si en el primer aislamiento no se manifiesta la β -hemólisis, debe intentarse nuevamente resembrando este primer cultivo y repitiendo la prueba.

BACILOS GRAMPOSITIVOS ANAEROBIOS**Algunas características morfológicas, culturales y bioquímicas útiles para la identificación de *Clostridium perfringens***

| | |
|---|--|
| Características morfológicas (coloración de Gram) | Bacilos grampositivos rectos o curvos, esporulados Esporas ovales y subterminales |
| Características culturales | En agar sangre anaerobio doble halo de hemólisis. Rápido desarrollo (24 hs.) Anaerobios obligados. Desarrollo a 37°C |

Características bioquímicas:

| | |
|--|---------------------------------|
| Movilidad | Negativa |
| Catalasa | Negativa |
| Lecitinasas | Positiva |
| Lipasa | Negativa |
| Digestión de la leche | Rápida y profusa |
| CAMP reversa Positiva (prueba confirmatoria) | Positiva (prueba confirmatoria) |

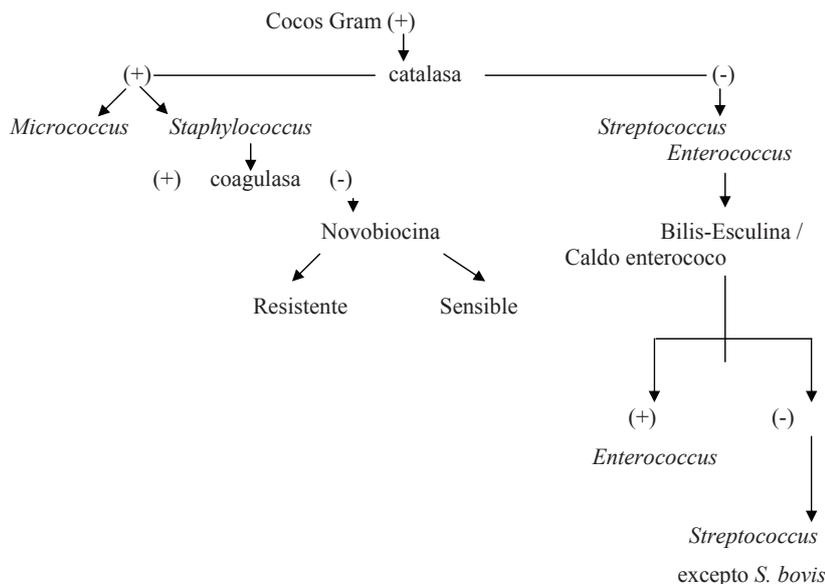
● **COCOS GRAMPOSITIVOS****PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ESTUDIO DE COCOS GRAM POSITIVOS MÁS FRECUENTES EN INFECCIONES HUMANAS**

Estas pruebas mínimas nos permiten ubicarnos dentro de las familias y son de extrema utilidad, ya que los tratamientos empíricos a instituir son distintos, según se trate de *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. o *Enterococcus* spp.

Sin embargo, es necesario profundizar el estudio bioquímico por lo ya apuntado para las enterobacterias y los BNF: es necesario tratar de identificar los aislamientos obtenidos lo más certeramente posible, ya que tiene importancia tanto clínica como epidemiológica así como seleccionar los antimicrobianos a ensayar (concentración del antibiótico) y su interpretación.

Es conveniente recordar que la morfología y, en especial la disposición, es un dato muy importante para la identificación presuntiva, y que muchas veces, en especial cuando se intenta determinar la morfología a partir del desarrollo colonial, podemos incurrir en errores.

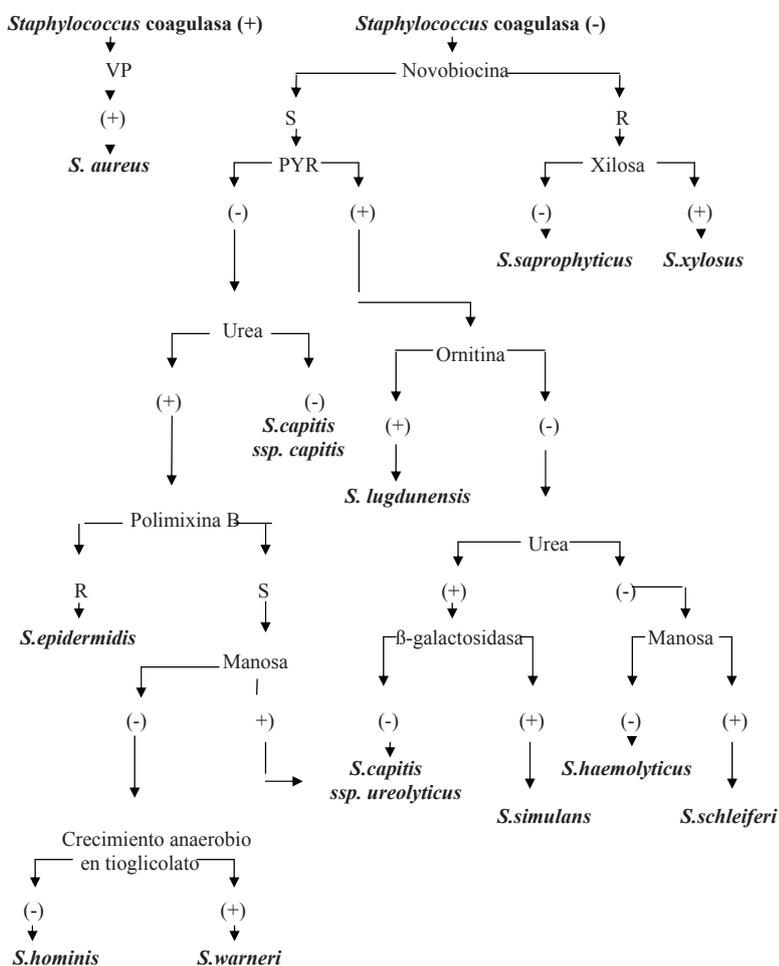
Por ello, se debe utilizar el desarrollo obtenido en medios líquidos.



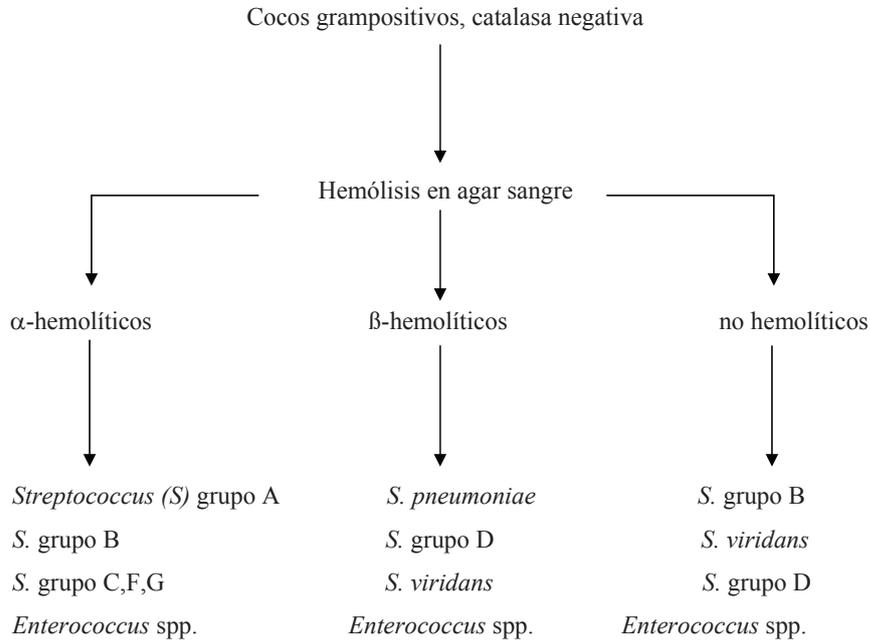
El recomendado es el caldo tioglicolato, para la observación (posterior a la realización de la coloración de Gram) de la disposición de los aislamientos obtenidos.

Pruebas de identificación de las especies de *Staphylococcus* de mayor significancia clínica

Pruebas de identificación de las especies de *Staphylococcus* de mayor significancia clínica



Pruebas de identificación de cocos grampositivos, catalasa negativa de mayor significancia clínica



La β-hemólisis puede estar enmascarada por la inhibición de la estreptolisina O por el oxígeno o por la producción de peroxidasa por estreptococos que crecen aeróbicamente o en presencia de CO₂.

Cortar el agar con el ansa, forzando la inoculación dentro del agar a fin de crear un ambiente relativamente anaeróbico. Incubar las placas a 35°C en CO₂.

● **COCOS GRAMNEGATIVOS AEROBIOS:**

Características diferenciales del género Neisseria y de Moraxella catarrhalis

| Organismo | Oxidasa | Desarrollo en agar nutritivo | Desarrollo en AS /A Choc con CO ₂ | Desarrollo en T-M con CO ₂ | Pigmento | TSI |
|------------------------|---------|------------------------------|--|---------------------------------------|----------|---------------|
| <i>N. gonorrhoeae</i> | + | - | + | + | - | No desarrolla |
| <i>N. meningitidis</i> | + | - | + | + | - | No desarrolla |
| <i>Neisseria</i> spp. | + | + | + | -* | v | Pico ácido |
| <i>M. catarrhalis</i> | + | + | + | v | - | Sin cambio |

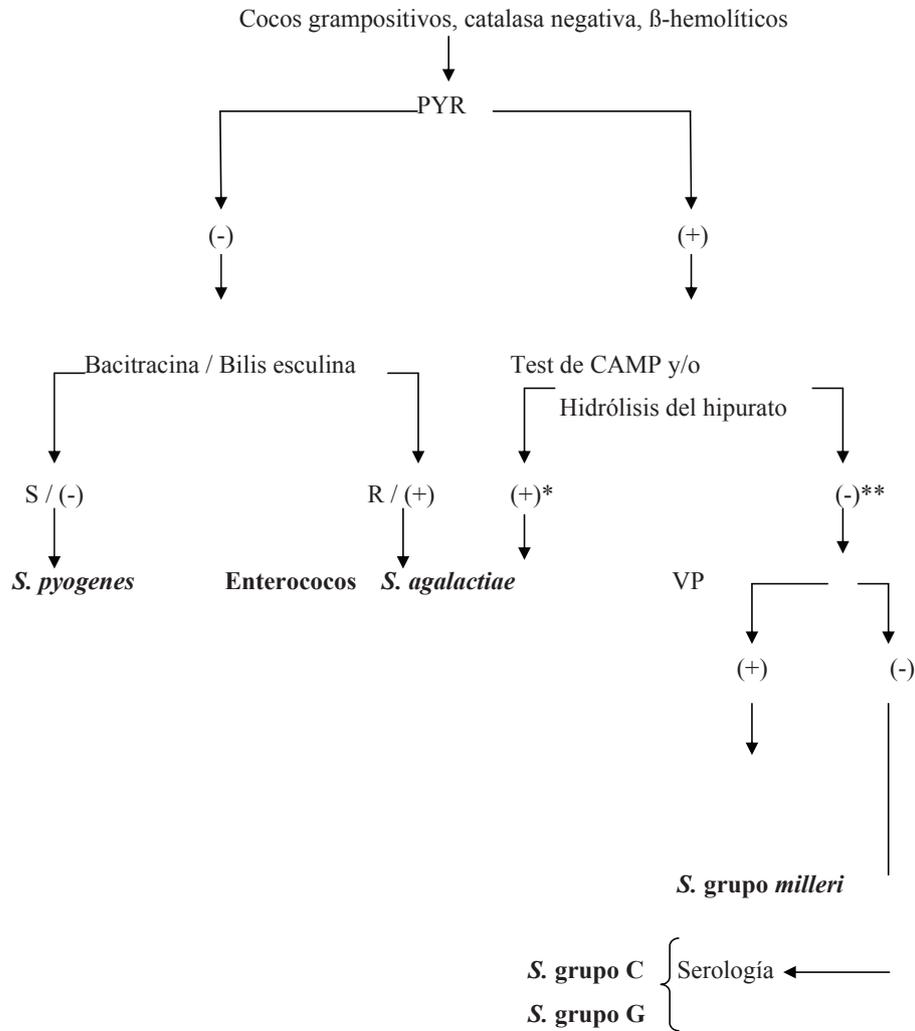
AS: agar sangre, A Choc: agar chocolate, T-M: Tayer-Marthin modificado

*:Algunas especies pueden desarrollar

| Organismo | Utilización de Hidratos de Carbono | | | | |
|------------------------|------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| | Glucosa | Maltosa | Lactosa | Sacarosa | Fructosa |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | + | - | - | - | - |
| <i>N. meningitidis</i> | + | + | - | - | - |
| <i>Neisseria</i> spp. | v | v | -* | V | V |
| <i>M. catarrhalis</i> | - | - | - | - | - |

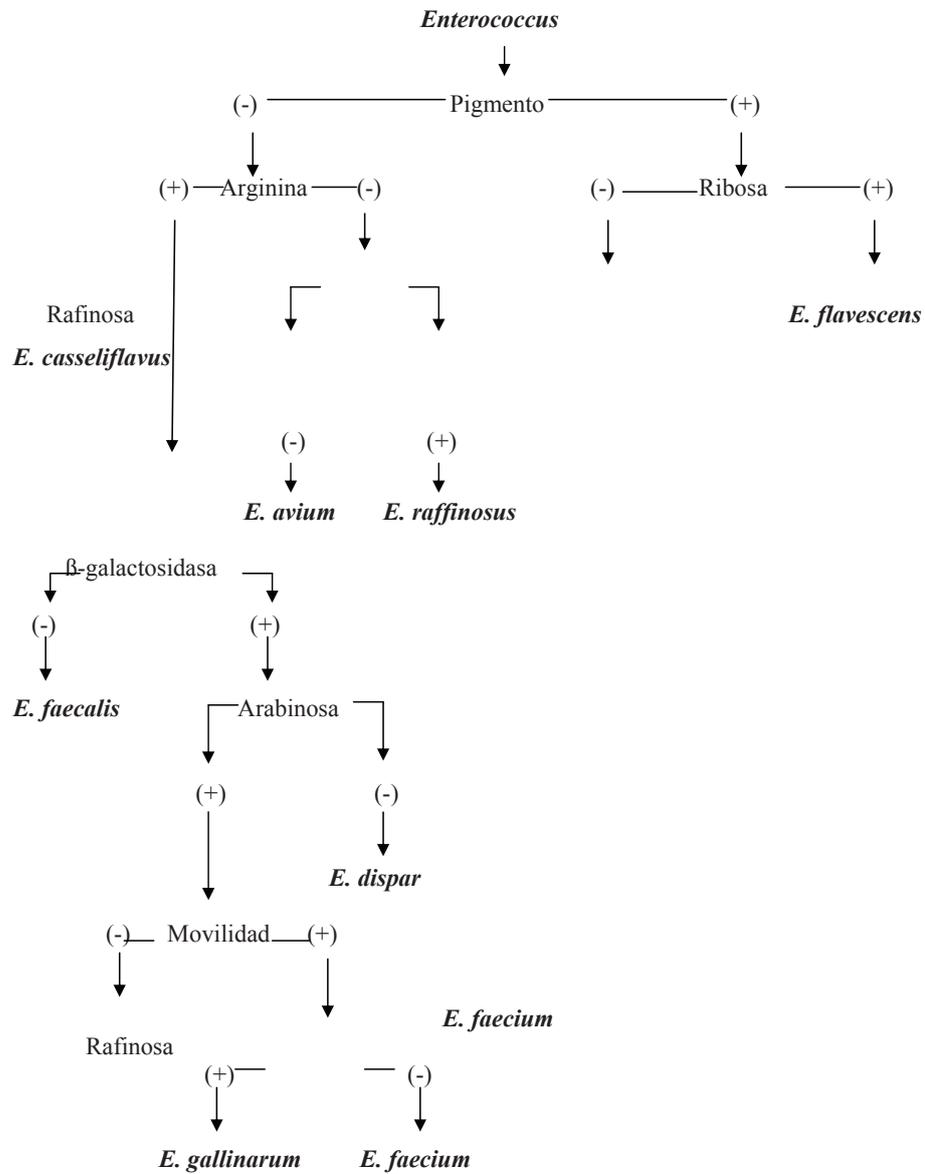
v: variable *: *N. lactamica* utiliza lactosa

Pruebas de identificación de cocos grampositivos, catalasa negativa β -hemolíticos de mayor significancia clínica



*ambas pruebas positivas. **ambas pruebas negativas. PYR: Pirrolinodil-aril-amidasa, VP: Voges-Proskauer.

Pruebas de identificación de enterococos de mayor significancia clínica



(Esquema adaptado de Koneman, Allen, Janda, Schreckenber, Winn. **Diagnostic Microbiology**. 5th ed. Ed. Lippincott. 1997).

ANEXO 2

Detalle de algunas de las técnicas, pruebas bioquímicas y medios de cultivo, mencionados en el texto

TÉCNICAS DE COLORACIÓN

- **COLORACIÓN DE MATERIA FECAL (MF) CON AZUL DE METILENO**

Colorear la muestra de MF con gotas de azul de metileno al 1% en suspensión ligera, entre porta y cubreobjeto.

Observar al microscopio en 400X, luego de 5 minutos (para un buen teñido nuclear).

- **COLORACIÓN DE MATERIA FECAL CON CARBOL FUCSINA (BÚSQUEDA DE *Campylobacter* spp.):**

Carbol fucsina (10% en etanol 95°) 40 ml.

Agua destilada 460 ml.

Preparar el extendido y fijar a la llama. Bañar con carbol fucsina y dejar actuar 30 seg. Lavar, secar y observar formas de gaviota, coma, C o m, con objetivo de inmersión.

Coloración de Albert:

Preparar el extendido y fijarlo con calor.

Bañar con colorante de Albert (azul de toluidina -0,15 gramos-, verde de malaquita -0,20 gramos-, ácido acético glacial -1 ml-, alcohol 95° -2 ml-, agua destilada -100 ml-) durante 3 a 5 minutos.

Lavar con agua corriente.

Bañar con solución de iodo de Gram (lugol) y dejar 1 minuto.

Lavar, secar con papel y examinar.

Los gránulos aparecen de color azul-negro, sobre el fondo verde de la célula bacteriana.

- **COLORACIÓN DE ZIEHL-NEESEN**

- Carbolfucsina: solución saturada de fucsina básica (3 gramos. de fucsina básica en 100 ml de alcohol etílico 95%), 10 ml; solución acuosa de fenol al 5%, 90 ml.
- Ácido-alcohol: 3 ml de HCl con alcohol etílico 95% para un volumen de 100 ml.
- Contracolorante: Azul de metileno, 0,3% acuoso

Fijar el frotis por calentamiento suave. Colocar carbolfucsina al portaobjeto y calentar hasta obtener vapores blancos, esperar hasta que desaparezcan los vapores y repetir este procedimiento tres veces.

Lavar con agua corriente.

Decolorar con alcohol-ácido hasta que no aparezca más color en los lavados.

Lavar con agua corriente

Contracolorar con azul de metileno unos 30 segundos.

Lavar con agua corriente y secar al aire.

• COLORACIÓN DE KOSTER

Por un minuto, cubrir con una mezcla recién preparada de 2 partes de solución acuosa saturada de safranina y 5 partes de 1 N de hidróxido de potasio.

Lavar con agua corriente.

Decolorar durante 10 a 20 segundos con ácido sulfúrico al 0,1%. Repetir la operación.

Lavar con agua corriente.

Cubrir con carbol-azul de metileno al 1%.

Lavar con agua corriente.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba de la oxidasa: Se puede utilizar dimetil o tetrametilfenilendiamina, recomendándose en ambos casos la sal de oxalato, por presentar mayor estabilidad.

La prueba de oxidasa solo debe realizarse con microorganismos de crecimiento fresco (18–24 horas).

Esta prueba puede ensayarse ya sea:

- a) usando discos impregnados con el reactivo de oxidasa. En este caso preparar en agua destilada estéril una suspensión de las colonias sospechosas, tomado con pinza estéril, incorporar el disco. Se observará cambio de color. Las colonias oxidasa positiva virarán a un color fucsia intenso, mientras que las negativas no sufren cambio de coloración.
- b) método del hisopo para la prueba de oxidasa de Kovac: Seleccionar las colonias sospechosas de la placa de cultivo (medio selectivo o no selectivo) con el hisopo. Añadir una gota de reactivo de oxidasa al hisopo usando una pipeta de Pasteur.
- c) usando una solución del reactivo (método indirecto de Kovacs). En este caso se debe preparar una solución acuosa al 1% con el reactivo de oxidasa (la cual puede conservarse en heladera a 4°C al abrigo de la luz).

Con esta impregnar un trozo de papel de filtro colocado sobre una cápsula de Petri, el papel de filtro deberá estar húmedo, pero no mojado, después de que el reactivo ha sido absorbido.

Con una varilla de vidrio, plástico o madera, hacer un extendido de una colonia sospechosa sobre el papel impregnado. (No usar asa de Nicromo).

Observar cambio de color.

La reacción de color positiva (aparición de color fucsia intenso) se produce a los 5 a 10 segundos.

En caso de que la colonia sea oxidasa negativa, no se produce variación de color del papel impregnado.

Recordar que si se realiza la prueba a partir de cepas desarrolladas en agar sangre, se debe tener cuidado de no arrastrar medio de cultivo ya que los glóbulos rojos reaccionan con el reactivo dando una reacción positiva.

Prueba de la catalasa: sobre una colonia se colocan unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3%.

La aparición de rápida efervescencia indica la producción de oxígeno molecular.

Tener cuidado, al realizar la prueba sobre colonias en agar sangre, por la presencia de peroxidasa en los eritrocitos.

Prueba de la catalasa para anaerobios: es conveniente utilizar H_2O_2 al 15%.

La prueba se realiza suspendiendo una colonia proveniente, de ser posible, de un medio que no contenga sangre.

No introducir el ansa metálica en la gota porque puede dar falsos positivos.

La reacción positiva es inmediata.

La aparición de burbujas, luego de 20 o 30 segundos, se considera una prueba negativa.

Prueba de la coagulasa en portaobjeto (“clumping factor”): se coloca una colonia sospechosa de pertenecer a una especie de *Staphylococcus*, y se emulsifica en una gota de plasma de conejo.

El “arracimamiento” bacteriano en 1 minuto indica la presencia de coagulasa y significa un resultado positivo. Si el resultado es negativo, ensayar la producción de coagulasa en tubo.

Prueba de la coagulasa en tubo: utilizar plasma con EDTA y no citratado, ya que organismos capaces de metabolizar el citrato (*Enterococcus* spp.) pueden dar resultados falsos positivos.

Inocular el plasma con la cepa a estudiar.

Las pruebas negativas, luego de 4 hs de incubación a 35°C, dejar a temperatura ambiente y leer luego de 18 a 24 hs a fin de evitar la fibrinólisis que producen algunas cepas al ser incubadas en forma prolongada a 35°C.

Prueba de la susceptibilidad a la Novobiocina: En agar Mueller Hinton, según técnica de Kirby-Bauer, utilizando discos de Novobiocina (5 µg).

Sensible: inhibición del desarrollo con un diámetro mayor o igual a 16 mm.

Prueba de la bilis-esculina: Se utilizan medios de cultivo comerciales.

La hidrólisis de esculina se observa como un oscurecimiento del medio (color negro) en 24 hs de incubación a 35°C, raramente se requieren 48 hs de incubación hasta que la hidrólisis sea aparente.

Es importante que el medio contenga 40% de bilis, ya que algunos productos contienen menos cantidad, lo que lleva a confundir algunos estreptococos viridans con enterococos.

Prueba del PYR: para esta prueba que detecta la enzima pirrolidónil arilamidasa, se utiliza como sustrato el reactivo L-pirrolidónil- beta-naftilamida (PYR), para la identificación rápida de enterococos.

Algunas especies de *Staphylococcus* y los estreptococos del grupo A dan, también, una prueba positiva.

Utilizar un alto inóculo (2 MacFarland) para el ensayo y seguir estrictamente las indicaciones del fabricante.

Prueba de fermentación de hidratos de carbono para cocos grampositivos: utilizar medio base de fermentación de hidratos de carbono (indicador: púrpura de bromocresol) y los azúcares en concentración del 1%.

Para cepas de desarrollo fastidioso, se suplementa el medio con extracto de levadura (1% a 2%).

Incubar hasta 72 horas a 35°C.

El viraje del indicador a amarillo (no a verde) indica un resultado positivo (acidez aeróbica).

Crecimiento anaerobio en tioglicolato: En medio tioglicolato con 0,3% de agar.

Pre-reducir los tubos antes de la inoculación (durante 10 minutos en baño de agua hirviendo y luego enfriados rápidamente en agua helada).

Sembrar 0,1 ml de un caldo de 18 a 24 hs, o de una suspensión salina (turbidez: 0,5 MacFarland). Incubar a 35°C hasta 7 días.

Prueba de la Bacitracina: En placas de agar sangre con discos de Bacitracina (0,04 U).

La siembra se realiza según la técnica de difusión en agar y la incubación se realiza con CO₂ durante 18 a 24 hs.

Cualquier zona de inhibición alrededor del disco es considerada positiva (sensible).

Recordar que el uso de discos de Bacitracina en forma directa en las placas primarias de cultivo puede dar como resultado un 40% a 50% de falsos negativos.

Test de CAMP: Se realiza utilizando una cepa β-hemolítica de *S. aureus* (ATCC 25923).

Los estreptococos grupo B secretan el factor CAMP que interactúa con la β-hemolisina secretada por *S. aureus* lo que causa un acrecentamiento o sinergismo de la hemólisis.

En placa de agar sangre sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y perpendicularmente a esta (lo más cerca posible, sin llegar a tocarla) sembrar la cepa de estreptococo en estudio.

Incubar 24 hs a 35°C en aerobiosis (en CO₂ aumentan los falsos positivos).

El sinergismo se observa como un área de β-hemólisis en forma de “punta de flecha” en la zona de desarrollo más cercana a ambas estrías.

Test de CAMP reversa: Inocular una placa de agar sangre con una estría del microorganismo en estudio.

En un ángulo de 90° estriar una cepa de *Streptococcus agalactiae* a unos pocos milímetros de la cepa incógnita.

Incubar en anaerobiosis 24-48 hs a 37°C.

Lectura: Hemólisis sinérgica (aumento): positiva

Ausencia de hemólisis: negativa

Pruebas de lecitinasa y lipasa para anaerobios: la acción de estas dos enzimas puede observarse subcultivando el microorganismo en estudio en una placa de agar yema de huevo (200 ml de agar base Columbia estéril, disolver y enfriar a 50°C.

Agregar asépticamente yema de huevo a una concentración final del 5%.

Mezclar y distribuir en placas de Petri.

Para obtener la yema de huevo: sumergir el huevo previamente en alcohol etílico durante 3 a 4 horas. Romper la cáscara y separar la yema.

Incubar en anaerobiosis 48 hs a 37°C.

Lectura:

Lecitinasa positiva: halo opaco blanco alrededor de la colonia y dentro del agar.

Lipasa positiva: iridiscencia sobre la colonia y la superficie del agar que la rodea (efecto nacarado) (incubar hasta 1 semana para descartar un resultado como negativo).

Acción sobre la leche para identificación de *Clostridium perfringens*: Leche 100 ml, cloruro de cisteína 0,05 gr, hemina 1 ml, pH: 7,3 a 7,4.

Distribuir 10 ml en tubos.

Autoclavar 30 minutos a 0,7 atmósferas (118°C).

Inocular el medio con el microorganismo en estudio.

Incubar en anaerobiosis a 37°C durante 4 días a 3 semanas antes de informar el resultado como negativo.

Lectura: coágulo.

Digestión: aclaramiento de la leche en el tubo.

La digestión puede ocurrir sin la formación del coágulo, o el coágulo puede ser digerido.

Prueba de la hidrólisis de hipurato para la identificación de *Streptococcus* spp.: La producción de hipuricasa resulta en la hidrólisis del hipurato de sodio con la formación de benzoato de sodio y glicina.

Se puede utilizar la prueba estándar para benzoato usando 7% de tricloruro férrico.

El cloruro férrico precipita proteínas, hipurato y benzoato, los dos primeros se disuelven en exceso de reactivo. Por lo tanto, la persistencia de un precipitado, tras añadir un exceso de cloruro férrico, indica la presencia de benzoato y una prueba positiva de hidrólisis de hipurato.

1- Sembrar un tubo de caldo con 1% de hipurato de sodio, con el organismo a investigar e incubar a 37°C durante 48 horas.

2- Centrifugar el medio y transferir 0,8 ml de sobrenadante claro a un tubo limpio.

3- Añadir al tubo 0,2 ml de revelador: tri-cloruro férrico. Mezclar bien y leer después de 5 minutos.

Prueba de la optoquina para la identificación de *Streptococcus* spp.: utilizar agar sangre y discos de optoquina de origen comercial.

La siembra se realiza según la técnica de difusión en agar y la incubación se realiza con CO₂ durante 18 a 24 hs.

Los halos de inhibición deben medirse.

Una zona de inhibición del crecimiento de 14 mm o más, indica susceptibilidad a la optoquina.

Si este diámetro es menor, se debe realizar la prueba de solubilidad en bilis porque algunos *Streptococcus viridans* y aerococos pueden dar pequeñas zonas de inhibición.

Aunque muy raras, algunas cepas de *S. pneumoniae* pueden ser resistentes a la optoquina.

Prueba de la solubilidad en la bilis para la identificación de *Streptococcus* spp.: se colocan unas gotas de solución de desoxicolato de sodio sobre las colonias sospechosas de ser *Streptococcus pneumoniae*, las que se lisan de inmediato y desaparecen por completo en 30 minutos.

Tener cuidado al usar agar sangre, porque aparece una zona de hemólisis alrededor de la gota de reactivo, reacción que no debe confundirse con la lisis de las colonias.

Susceptibilidad a TMS para la identificación de *Streptococcus* spp.: En agar Mueller Hinton con sangre de oveja, según técnica de Kirby-Bauer, utilizando discos de TMS (1,25/23,75 µg).

Sensible: inhibición del desarrollo (cualquier tamaño de halo).

Prueba de hidrólisis de esulina: en medio líquido: Peptona 5 gr., Fosfato dipotásico 1 gr., Esculina 3 gr., Citrato férrico 0,5 gr., Agua destilada 1000 ml., pH 7,1.

Esterilizar a 121°C, 15 minutos.

Distribuir en tubos estériles. Sembrar e incubar a 35°C durante 7 días.

La formación de un precipitado negro se considera un resultado positivo.

Incubar a 35°C por una semana o más.

Prueba de la cuerda para identificación de *Vibrio* spp.: suspender un crecimiento de 18 a 24 hs de un agar no selectivo en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5% sobre un portaobjetos.

Se formará una cuerda mucoide cuando se introduzca lentamente un asa de inoculación en la suspensión, por degradación del ADN bacteriano. Las cepas de *V. cholerae* son positivas, mientras que por lo general las cepas de *Aeromonas* son negativas.

Prueba de la movilidad a 25°C para identificación de *Listeria monocytogenes*: se realiza por siembra en punción en agar nutritivo semisólido (agar al 0,5%) o en medio SIM (Sulfhidrilo-Indol-Movilidad).

Se incuba 6 horas a 35°C y luego se deja a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

La formación de una característica “sombrija” o de una línea de desarrollo a 1 cm de la superficie de la columna de agar, es característica de *L. monocytogenes*.

Observación de producción de pigmento para identificación de *Enterococcus* spp: observar color amarillo intenso de las colonias en agar nutritivo.

Prueba de la movilidad: para identificación de *Enterococcus* spp.: en fresco (entre porta y cubre), partir de un cultivo de 24 hs en caldo tioglicolato incubado a temperatura ambiente; o en medio semisólido de movilidad.

Prueba de tolerancia al cloruro de sodio: los enterococos toleran y pueden crecer en presencia de 6,5% de cloruro de sodio.

Crecimiento en agar nutritivo a temperatura ambiente para identificación de *Neisseria* spp.: Esta prueba permite la diferenciación entre las neisserias patógenas (*N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*) y neisserias saprófitas.

Consiste en la siembra en un pico de agar nutritivo que se incuba a temperatura ambiente de la cepa en estudio.

Mientras que las neisserias saprófitas no tienen dificultades para desarrollar en un medio simple como agar nutritivo o agar tripticasa soya, las patógenas no pueden hacerlo.

Fermentación de azúcares para identificación de *Neisseria* spp.: Las reacciones de fermentación se pueden realizar en agar o agar semisólido enriquecido con cistina y caseína, a los cuales se les añade cada azúcar en proporción del 1% y un indicador de pH.

La incubación se realiza a 35°C en cámara húmeda y con una atmósfera de 3-10% de CO₂ entre 24 y 72 hs.

La fermentación de los diferentes azúcares se visualizará por un cambio en el pH (color) del medio. Se trata de fermentación sin producción de gas.

Superoxol / Catalasa para identificación de *Neisseria* spp.: La prueba de superoxol es sencilla; usa 30% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como reactivo.

Las reacciones de superoxol con *N. gonorrhoeae* son típicamente “explosivas” (4+, muy fuertes), en comparación con las reacciones más débiles (2+) de la mayoría de las especies de las Neisserias no gonocócicas, y las reacciones negativas de *K. denitrificans*.

Por el contrario, la prueba de la catalasa que se realiza con peróxido de hidrógeno al 3% da resultados más débiles, por lo que se sugiere hacer la prueba de superoxol (30% H₂O₂) cuando se disponga del reactivo.

Esto se debe a que los resultados con el reactivo de superoxol se pueden diferenciar mejor para los aislamientos de *N. gonorrhoeae* que aquellos obtenidos con el reactivo de catalasa.

- a) Realizar la prueba con un crecimiento de 18 a 24 horas de un cultivo puro de un medio selectivo o no selectivo usando un asa de inoculación o un hisopo estéril y colocar en un portaobjetos limpio
- b) Colocar una gota de reactivo en el crecimiento usando un gotero o una pipeta.
- c) Las cepas de *N. gonorrhoeae* tienen una reacción típica muy fuerte (4+), “explosiva” al contacto con el reactivo superoxol. La catalasa dará una reacción mucho más débil (1+ o 2+).

Las pruebas de superoxol / catalasa se pueden desarrollar directamente en una placa.

Sin embargo, debe notarse que el peróxido de hidrógeno reacciona con los glóbulos rojos aunque no se han observado reacciones en agar chocolate.

Si la prueba se va a hacer en una placa de agar, colocar una gota de reactivo en la superficie de una placa no inoculada del medio (o en un área sin crecimiento de la placa de la prueba) para asegurar que no haya reacción con medio y reactivo solamente.

Si hubiera reacción, la prueba debe realizarse en una lámina (o en una placa de Petri).

Debe notarse que algunas cepas de *N. meningitidis* y *M. catarrhalis* tendrán una reacción fuerte no “explosiva” a superoxol al añadir peróxido de hidrógeno.

Para alguien que no está familiarizado con la prueba, esto le puede parecer como la reacción característica de *N. gonorrhoeae*.

Esta prueba, por ello, no es definitiva para *N. gonorrhoeae*, aunque sí es diferencial.

Resistencia a colistina para identificación de *Neisseria* spp.: La resistencia a la colistina puede determinarse tanto en un medio selectivo que contenga colistina (por ejemplo, TM)

o en agar chocolate GC usando los principios de la difusión en disco (con un disco de 10 µg de colistina).

- a) Preparar una suspensión de un cultivo puro de toda la noche (aproximadamente igual a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland) en caldo de Mueller-Hinton o buffer salina fosfato (BSF).
- b) Inocular la placa agar chocolate GC de manera uniforme usando un hisopo estéril o un asa. Dejar secar la placa hasta que no se vea la superficie húmeda.
- c) Aplicar un disco de colistina (10 µg) al centro de la placa y apretar hacia abajo para asegurar que se encuentra en contacto parejo con la superficie. Incubar a 35 a 36,5°C en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad incrementada durante 18 a 24 horas.

Después de la incubación, examinar la placa para detectar la inhibición del crecimiento alrededor del disco de colistina.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* son resistentes a la colistina y crecerán alrededor de todo el disco al igual que las cepas de *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *K. denitrificans*.

Por el contrario, las cepas comensales de especies de *Neisseria*, la mayoría de las cuales son susceptibles a la colistina, mostrarán zonas de inhibición de al menos 10 mm de diámetro con un inóculo no estandarizado.

Algunas cepas de biovars de *N. subflava*, *N. cinerea* y *M. catarrhalis* pueden ser suficientemente resistentes a la colistina e incluso crecer sobre el disco.

Es por ello que la prueba de resistencia a la colistina no es definitiva para identificar *N. gonorrhoeae*, pero ayudará en la diferenciación entre estas especies y muchas especies comensales.

Prueba de reducción de nitrato para identificación de *Neisseria* spp.: la prueba de reducción de nitrato está disponible comercialmente. También puede prepararse fácilmente en el laboratorio.

Esta prueba permite distinguir entre las especies que pueden reducir el nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂) o nitrógeno gaseoso.

La prueba es útil para diferenciar entre cepas de *N. gonorrhoeae* (negativas a nitrato) y *K. denitrificans* o *M. catarrhalis* (dos especies positivas a nitrato que algunas veces se confunden con *N. gonorrhoeae*).

La prueba de nitrato se realiza en un caldo de nitrato estándar que se inocula en abundancia para obtener una suspensión densa de microorganismos.

Muchas especies de *Neisseria* no pueden crecer en este medio, la reacción para estas especies dependerá de enzimas preformadas en el inóculo.

La prueba debe realizarse exactamente como se la describe, a fin de que los resultados sean correctos para la identificación.

La reducción de nitrato solamente se da bajo condiciones de anaerobiosis; es por ello importante asegurar una razón baja entre tamaño de superficie y profundidad para limitar la difusión de oxígeno dentro del medio durante la prueba.

Estas condiciones se lograrán poniendo 5 ml de medio en un tubo de 13 mm de diámetro con tapa de rosca. Es importante realizar un control del medio y controles negativo y positivo, ya que esta prueba es compleja y los controles nos indicarán si los medios de cultivo y los reactivos están reaccionando apropiadamente.

Las pruebas de control de calidad deben realizarse cada vez que se prueben aislamientos clínicos.

Estudio de los factores X y V para identificación de *Haemophilus* spp.:

- a- Técnica del disco: para ello preparar en un caldo adecuado una suspensión densa de células de una placa de aislamiento primario, evitando el traslado del medio de agar al caldo (aún la muestra más pequeña de agar afectará la prueba debido a que el agar primario contiene los factores X y V). Inocular la superficie de una placa con agar tripticasa soya o agar infusión cerebro-corazón con la cepa en estudio. Colocar en puntos separados los discos con el factor correspondiente. Incubar en CO₂ durante 18 a 24 hs a 35°C. Aparecerá desarrollo alrededor de aquellos discos que provean el factor necesario para el germen.
- b- Medios líquidos adicionados con factores: a partir del desarrollo de la cepa problema, cuidando de no arrastrar medio de cultivo, se inoculan cuatro tubos con caldo nutritivo o agua peptonada. El primer tubo se deja como control: no debe dar desarrollo si se trata de *Haemophilus*; al segundo se le añade una gota de factor X, al tercero una de factor V y al cuarto una de ambos (factor X y factor V). El desarrollo se evidencia por turbidez.
- c- Satelitismo: varias cepas bacterianas (por ejemplo *Staphylococcus* β-hemolíticos), son productoras del factor V. Inocular en una placa de agar nutritivo y en una placa de agar sangre, el germen en estudio, en líneas paralelas y cruzando en ángulo recto las estrías anteriores, sembrar una ansada de *Staphylococcus*. Incubar 18 a 48 hs. a 35°C. Los gérmenes que requieren ambos factores, crecerán en placa de agar sangre, cerca de la cepa de *Staphylococcus*, siendo las colonias más numerosas y de mayor tamaño en la vecindad de este; pero no aparecerán en la placa de agar nutritivo, que solamente provee el factor V.

MEDIOS DE CULTIVO

Agar chocolate con Isovitalax: preparar agar base sangre o Agar Infusión Cerebro Corazón de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Autoclavar 15 minutos a 121°C, luego calentar a 90°C y adicionar 10% de sangre desfi-brinada bovina o de caballo.

Agitar suavemente hasta que el medio tome color chocolate.

Dejar enfriar aproximadamente a 50°C y agregar Isovitalax al 1% (concentración final).

Medios enriquecidos con el Suplemento N: (extracto de levadura 1g, glucosa 1,3 g, Na Cl 20 g, fosfato disódico 20 g, fosfato monopotásico 4 g, peptona bacteriológica 10 g, agua destilada 800 ml, suero bovino o de caballo 200 ml).

Disolver el extracto de levadura en 200 ml de agua.

Disolver las sales en 200 ml de agua por calentamiento.

Añadir el resto de los componentes excepto el suero.

Esterilizar en autoclave 15 minutos, 1 atm.

Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar el suero en condiciones de esterilidad).

Medio bifásico: agar Chocolate más caldo BHI-Sacarosa 20%.

Preparar agar chocolate distribuir en tubos estériles con tapa a rosca, dejar solidificar en pico de flauta.

Agregar luego asépticamente caldo BHI-Sacarosa 20% hasta cubrir el pico en un 50%.

Realizar control de esterilidad por 48 hs. a 35°C en atmósfera normal.

Caldo BHI 20% Sacarosa: preparar caldo BHI de acuerdo a las instrucciones del fabricante y luego añadir:

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Sacarosa | 20 grs. cada 100 ml de caldo |
| SO ₄ Mg.7H ₂ O | 0,25 grs. cada 100 ml de caldo |

Distribuir en botellitas de 50 ml y autoclavar 20 minutos a 1 atm.

Medio de fermentación de azúcares para la identificación de *Neisseria* spp.: Medio agar Tripticasa– Cistina (Medio CTA)

| | |
|--------------------|------------|
| Cistina | 0,5 grs. |
| Tripticasa peptona | 20,0 grs. |
| Cloruro de Sodio | 5,0 grs. |
| Sulfito de sodio | 0,5 grs. |
| Rojo fenol | 0,017 grs. |
| Agar | 2,5 grs. |
| Agua destilada | 1000 ml |
| PH: | 7,3 |

Autoclavar durante 15 min a 12 libras de presión.

Agregar al medio base estéril, en condiciones asépticas, soluciones estériles de los carbohidratos a ensayar, a fin de obtener una concentración final de 0,5%.

Los tubos preparados se conservan a temperatura ambiente si están preparados con tapón de algodón.

Los tubos preparados con tapa a rosca pueden ser guardados refrigerados por largo tiempo.

Medio de fermentación de azúcares para la identificación de *Neisseria* spp.: Medio de agar Mueller –Hinton más azul de bromotimol

Añadir a 100 o 200 ml de agar Mueller- Hinton estéril, 1,5 % de solución de azul de bromotimol al 1%.

Esterilizar 15 min. a 15 libras y 121°C.

Agregar al medio base estéril, en condiciones asépticas, soluciones estériles de los carbohidratos a ensayar a fin de obtener una concentración final del 1%.

Distribuir en placas de Petri.

Mantener, luego de las primeras 24 hs., refrigeradas a 4°C.

Solución de azul de bromotimol al 1%.

| | |
|-------------------------------|--------|
| Azul de bromotimol | 5,0 gs |
| OH Na (0,1N) (4,0 grs./100ml) | 25 ml |
| Agua destilada | 475 ml |

Disolver el azul de bromotimol en la solución de OHNa.

Mantener a 37°C durante 48 hs. agitando frecuentemente.

Agregar el agua destilada hasta completar la dilución y filtrar.

Mantener a temperatura ambiente.

Medio Fluorescencia-Lactosa-Nitrato (FLN) para identificación de BNF: está formulado para detectar la capacidad de producir fluoresceína, acidificación a partir de lactosa y reducción de nitratos (o nitritos) a gas nitrógeno por *Pseudomonas* spp. y otros BNF.

La fluoresceína es un pigmento luminiscente orgánico que al ser excitado con luz ultravioleta emite una fluorescencia verde-amarilla.

La fluorescencia de colonias no puede detectarse en medios de aislamiento, deben emplearse medios con sales catiónicas como sulfato de magnesio, que actúan como activadores o coactivadores para intensificar la luminiscencia.

La búsqueda de fluorescencia se realiza examinando el tubo con una fuente de luz UV. Un brillo amarillo-verde constituye una prueba positiva.

La reducción de nitrato a gas nitrógeno, se conoce como desnitrificación y es muy útil para diferenciar especies de *Pseudomonas* (muchas cepas son positivas) de otros BNF.

La presencia de burbujas de gas en la profundidad del medio, indica que se ha producido gas nitrógeno por desnitrificación.

El agregado de lactosa y rojo fenol permite detectar la formación de ácido a partir de la utilización de lactosa, lo que es útil para identificar al grupo fuertemente lactosa positivo de no fermentadores.

Un pico de flauta amarillo es la señal que se ha producido ácido por la utilización de lactosa por parte del microorganismo.

Medio FNL (1 g proteosa peptona N° 3; 2 g lactosa; 1,5 g agar; 0,2 g NO_3K o NO_3Na ; 0,05 g NO_2K o NO_2Na ; 0,15 g $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g K_2HPO_4 ; 0,05 g glucosa; 0,05 g acetato de $\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g Rojo de fenol; 100 ml agua destilada):

Antes de adicionar el agar, ajustar el pH a 7,8.

Distribuir en tubos con tapa a rosca.

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Solidificar mitad estría, mitad punción.

Medio de motilidad nitrato (MN) para identificación de BNF: (extracto de carne 0.3 g; peptona 0,5 g; NO_3K 0,1 g; agar 0,3 g; agua destilada 100 ml; pH 7).

Distribuir en tubos con tapa a rosca.

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Agar sangre anaerobio: agar Brucella o agar Columbia 43 gr., Solución de hemina (5mg/ml) 1 ml, Vitamina K (sol.1 mg/ml) 1ml (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentración final, agua destilada 1000 ml).

Suspender los ingredientes en agua, disolver por calentamiento.

Autoclavar 15 minutos a 121°C.

Enfriar hasta 50°C y agregar asépticamente sangre al 5%.

Mezclar y distribuir en placas de Petri.

Medio de Ellinghausen, McCulough, Johnson y Harris (EMJH) para búsqueda de *Leptospira* spp.:

1- Preparar las siguientes soluciones madre:

- | | |
|---|---------|
| a. NH_4Cl | 25 gr. |
| Agua destilada | 100 ml |
| b. $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.4 gr. |
| Agua destilada | 100 ml |
| c. $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1 gr. |
| Agua destilada | 100 ml |
| d. $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1 gr. |

| | |
|--|---------|
| Agua destilada | 100 ml |
| e. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 gr. |
| Agua destilada | 100 ml |
| f. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.3 gr. |
| Agua destilada | 100 ml |
| g. Glicerol | 10 ml |
| Agua destilada | 90 ml |
| h. Tween 80 | 10 ml |
| Agua destilada | 90 ml |
| j. Tiamina (Sigma) | 0.5 gr |
| Agua destilada | 100 ml |
| k. Vitamina B12 (Sigma) | 0.02 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

2. Preparar el medio base de la siguiente manera:

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Na_2HPO_4 | 1 gr |
| KH_2PO_4 | 0.3gr. |
| NaCl | 1gr |
| NH_4Cl (solución a) | 1 ml |
| Tiamina (solución j) | 1 ml |
| Glicerol (solución g) | 1 ml |
| Agua destilada | 997 ml |

Ajustar a pH 7,4 y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121°C.

3. Preparar el suplemento con albúmina de la siguiente manera:

| | |
|--|--------|
| Albúmina bovina, fracción V (Sigma) | 20gr |
| Agua destilada | 100 ml |
| Agregar la albúmina al agua en un Erlenmeyer de 500 ml y colocarlo en el agitador. Mientras la solución es agitada agregar lentamente las siguientes soluciones madre: | |
| Cloruro de calcio (solución c) | 2 ml |
| Cloruro de magnesio (solución d) | 2 ml |
| Sulfato de cinc (solución b) | 2 ml |
| Sulfato de cobre (solución f) | 0.2 ml |
| Sulfato de hierro (solución e) | 20 ml |
| Vitamina B12 (solución k) | 2 ml |
| Tween 80 (solución h) | 25 ml |

Ajustar el pH a 7,4 y llevar el volumen a 200 ml con agua destilada.

Esterilizar por filtración a través de una membrana con poro de 0,45 μm .

Agregar 1 parte del suplemento de albúmina a 9 partes de medio base.

Medio semisólido de FLETCHER para búsqueda de Leptospira spp.:

Esterilizar 1,76 litros de agua destilada en el autoclave a 121°C durante 30 min.

Enfriar a temperatura ambiente y agregar 240 ml de suero normal de conejo estéril.

Inactivar por incubación a 56°C durante 40 min.

Agregar 120 ml de agar extracto de carne al 2,5%, fundido y enfriado a 56°C con pH 7,4.

Distribuir 5 ml en tubos estériles de 16 x 120 mm con tapa a rosca y 15 ml en botellas estériles de 25 ml con tapón del tipo diafragma.

Inactivar a 56°C durante 60 min en dos días sucesivos.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA ANEXOS 1 Y 2:

- Bacterias Anaerobias. Guía práctica para el procesamiento de muestras clínicas. Sub-Comisión Anaerobios SADEBAC- División AAM. 1995.
- Curso de Postgrado. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae*. Ministerio de Salud y Acción Social. Dirección Nacional de Medicina Sanitaria. Instituto Nacional de Microbiología “Carlos G. Malbrán” 1992.
- Curso de Postgrado. Género *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium* y microorganismos relacionados. Universidad Nacional de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 1995.
- Gobernado, M.; López-Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, 21(Supl. 2): 54-60. 2003.
- Isenberg, H. D. (Ed). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM press, Whashington D.C. 1998.
- Joklik, W. K.; Willett, H. P.; Amos, D. B.; Wilfert, C. M. (Eds). *Zinsser. Microbiología - 20ª Edición*. Ed. Panamericana. 1994.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenber, P. C.; Winn, W. C. (Eds). *Diagnostic Microbiology*. 5th Edición. Ed. Lippincott. 1997.
- Mac Faddin. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Panamericana. 1980.
- Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Edición. American Society for Microbiology, ASM Press. 1999.
- Vergara, M.; Quiroga, M.; Pegels, E.; Husulak, E.; Oviedo, P.; Villalba, V.; Miranda, A. M. *Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica*. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. 2001.
- WHO/CDC/CSR/RMD. *Manual de Laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la Salud Pública en el mundo en desarrollo*. 2003.
- Guía Curso Meningitis Bacteriana. Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico-ANLIS “Dr. C. Malbrán”, 1992.
- CDC. *Laboratory methods for diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae**. 1998.
- WHO. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003.