

---



# **BACTERIOLOGIA DIAGNOSTICA**

**NORMAN ROJAS  
ESTEBAN CHAVES  
FERNANDO GARCÍA**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE MICROBIOLOGIA**

**2006**

---

# **BACTERIOLOGIA DIAGNOSTICA**

## **INDICE GENERAL**

<b>INDICE GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MÉDICA.....</b>	<b>3</b>
<b>NORMAS DE CALIDAD EN BACTERIOLOGIA MEDICA .....</b>	<b>9</b>
<b>ASPECTOS BASICOS EN BACTERIOLOGIA .....</b>	<b>18</b>
<b>ENTEROBACTERIACEAE.....</b>	<b>22</b>
<b>VIBRIONACEAE.....</b>	<b>32</b>
<b>PSEUDOMONAS Y BURKHOLDERIA .....</b>	<b>40</b>
<b>OTROS BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES.....</b>	<b>46</b>
<b>BACTERIAS GRAM NEGATIVAS FASTIDIOSAS.....</b>	<b>55</b>
<b>BACILOS GRAM POSITIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>STAPHYLOCOCCUS .....</b>	<b>69</b>
<b>STREPTOCOCCUS Y ENTEROCOCCUS .....</b>	<b>78</b>
<b>PRUEBAS SEROLOGICAS EN BACTERIOLOGIA .....</b>	<b>86</b>
<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLINICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>SELECCION, RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CLINICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>PROCESAMIENTO DE UROCULTIVOS.....</b>	<b>99</b>
<b>PROCESAMIENTO DE COPROCULTIVOS .....</b>	<b>113</b>

<b>PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS.....</b>	<b>126</b>
<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS .....</b>	<b>138</b>
<b>APENDICE A .....</b>	<b>144</b>

## I NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MÉDICA.



### 1. Introducción

El trabajo en el laboratorio de bacteriología médica debe ser considerado de alto riesgo para todo el personal de laboratorio debido al manejo de muestras clínicas potencialmente contaminadas con patógenos microbianos y de cultivos de microorganismos obtenidos a partir de dichas muestras clínicas. La exposición del personal de laboratorio a este riesgo debe ser minimizada y controlada mediante un plan de bioseguridad en el laboratorio clínico. Los riesgos biológicos infecciosos más comunes en el laboratorio clínico incluyen cultivos de microorganismos (bacterias, micobacterias, hongos, virus y parásitos) en altas concentraciones, muestras clínicas de origen humano o animal conteniendo agentes infecciosos y otros riesgos como toxinas, alérgenos, productos recombinantes, etc.

Es importante considerar que existen cuatro elementos necesarios para que se inicie una infección; un hospedero susceptible, un agente infeccioso, la concentración de dicho agente infeccioso (dosis infectante), y una ruta de transmisión. Esta última es la única que puede ser controlada por medio de normas de bioseguridad y por lo tanto es indispensable brindarle especial atención a las rutas más comunes de transmisión; oral, respiratoria, percutánea y contacto directo con la piel y/o las mucosas.

Toda muestra clínica; fluidos corporales, tejidos y cultivos microbianos deben ser considerados como infecciosos para el personal de laboratorio y deben ser manipulados bajo determinadas medidas de contención, las cuales incluyen adecuadas prácticas microbiológicas, la utilización de barreras físicas, un adecuado diseño de laboratorio y cámaras de bioseguridad. El uso de vacunas seguras y eficaces puede proporcionar un mecanismo adicional para la reducción de las infecciones ocupacionales.

El establecimiento de los programas de bioseguridad en el laboratorio de bacteriología médica es responsabilidad de los administradores del mismo. Sin embargo, es importante tener claro que no es posible crear un ambiente de laboratorio saludable y seguro sin que cada una de las personas que laboran en él no asuma su cuota de responsabilidad hacia la seguridad en el laboratorio.

### 2. Clasificación de microorganismos por grupos de riesgo

El concepto de grupo de riesgo fue desarrollado como una manera de clasificar los diferentes tipos de microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos) dependiendo del grado de virulencia para el ser humano, animales y plantas. Se han definido cuatro grupos de riesgo de microorganismos, cuyas características se indican a continuación:

Grupo de riesgo	Características de los microorganismos <sup>1</sup>
1	En este grupo se incluyen microorganismos que durante mucho tiempo han sido estudiados y/o cultivados bajo diversas circunstancias y se ha demostrado, con base al conocimiento científico actual, que no representan ningún riesgo para la salud humana y para su medio ambiente, aunque algunos de estos microorganismos podrían representar algún riesgo para niños o para adultos inmunosupresos: <i>Bacillus subtilis</i> , cepas no patógenas de <i>Escherichia coli</i> .
2	En este grupo se incluyen microorganismos de moderado riesgo potencial para el personal de laboratorio y que usualmente están asociados con enfermedad en seres humanos: <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> .
3	En este grupo se incluyen microorganismos altamente infecciosos y que pueden causar graves enfermedades sistémicas en seres humanos: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Brucella</i> spp.
4	En este grupo se incluyen microorganismos exóticos, altamente infecciosos, causantes de enfermedades mortales en el ser humano para los cuales no existe un tratamiento efectivo: virus Ebola, virus Hanta.

### 3. Cámaras de bioseguridad

Las cámaras de bioseguridad son utilizadas para reducir la contaminación y minimizar la exposición del personal de laboratorio a los agentes microbianos. Todos aquellos procedimientos que generen aerosoles o que involucren la manipulación de patógenos microbianos que puedan causar infección por inhalación deben ser llevados a cabo en cámaras de bioseguridad. Las cámaras de bioseguridad de clase II son recomendadas para laboratorios de niveles de bioseguridad 2 y 3. La protección del personal está dada por el movimiento del aire del cuarto hacia la abertura frontal de la cámara, de manera que la seguridad del personal estará comprometida si el flujo de aire es distorsionado por otras corrientes de aire en el laboratorio. Por tal motivo, las cámaras de bioseguridad deben ser colocadas en lugares distantes de las puertas, pasillos o sitios en el laboratorio donde exista mucha actividad.

Al igual que en otros procedimientos, el personal de laboratorio que haga uso de la cámara de bioseguridad debe ser apropiadamente entrenado. Se debe utilizar gabachas de manga larga y guantes para proteger las manos y los antebrazos de una posible contaminación. La superficie de trabajo debe ser descontaminada antes de introducir el material de trabajo. Todos los materiales y el equipo a utilizar deben estar colocados en su lugar antes de que se inicie el trabajo. En las cámaras de bioseguridad clase II no se debe colocar absolutamente nada sobre las rejillas de salida del flujo de aire.

La organización de la superficie de trabajo es importante. Los materiales contaminados deben ser separados de los materiales limpios y/o estériles de manera que los primeros no pasen sobre los segundos, se debe tomar en todo momento en cuenta la técnica aséptica y el material contaminado se debe descartar desinfectado y tapado.

Las cámaras de bioseguridad clase II utilizan un flujo de aire no turbulento denominado flujo laminar que evita tanto el escape de material infeccioso de la cámara como el ingreso de este del cuarto hacia el interior de la misma.

La operación y el mantenimiento de las cámaras de bioseguridad clase II deben incluir el dejar funcionando el sistema de flujo laminar permanentemente, aun cuando no se esté utilizando la cámara, la aplicación de luz ultravioleta en el interior de la cámara, la desinfección rutinaria de la superficie de trabajo con desinfectantes apropiados y el cambio anual de los prefiltros del sistema.

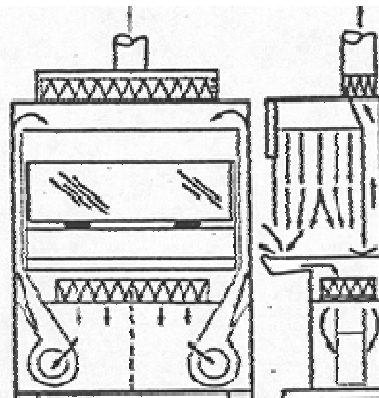


Fig. 1 Cámara de flujo laminar tipo II

#### 4. Niveles de bioseguridad

##### *Nivel de bioseguridad 1*

En el nivel de bioseguridad 1 los microorganismos que pueden ser manipulados están bien definidos y caracterizados por tener una muy baja o ninguna virulencia para personas adultas saludables y pertenecen al grupo de riesgo 1. El acceso a este laboratorio debe ser limitado o restringido y las puertas y ventanas deben permanecer cerradas, el mobiliario debe ser fácil de lavar y desinfectar y tienen que estar disponibles lavamanos con jabón, desinfectante y papel toalla. Todos los desechos generados que implican algún riesgo biológico deben ser autoclavados o incinerados.

Los procedimientos operativos deben estar incluidos en las guías de bioseguridad en el laboratorio, deben estar claramente detalladas por escrito y accesibles en todo momento para el personal de laboratorio. Se debe proporcionar un entrenamiento inicial en prácticas microbiológicas, en las guías de bioseguridad y en los procedimientos para el control de las infecciones a cada uno de los nuevos empleados, estudiantes y visitantes.

### **Nivel de bioseguridad 2**

En laboratorios del nivel de bioseguridad 2 es donde se efectúa la mayor parte del trabajo rutinario del laboratorio de bacteriología clínica, incluyendo el manejo de muestras clínicas de diversa índole y la manipulación de cultivos de microorganismos.

En este laboratorio debe estar disponible una autoclave para esterilizar todos los desechos infecciosos y los procedimientos que involucren la generación de aerosoles deben ser efectuados en una cámara de bioseguridad clase II. Se deben utilizar guantes, anteojos protectores y bozales cuando se manipulan muestras clínicas, cultivos microbianos o material contaminado.

Se debe limitar al máximo el uso de agujas y jeringas y extremar los cuidados para minimizar el riesgo de una autoinoculación y de generación de aerosoles. Todos los derrames de material infecciosos y accidentes deben ser inmediatamente reportados al responsable del laboratorio y al director del laboratorio clínico.

El director del laboratorio clínico, con el apoyo de los responsables de los diferentes laboratorios a su cargo, es el responsable directo de establecer y/o aprobar todas las políticas y los procedimientos para la operación segura del laboratorio.

### **Nivel de bioseguridad 3**

Los microorganismos que deben ser trabajados en el nivel de bioseguridad 3 son altamente infecciosos, pueden causar graves infecciones sistémicas en seres humanos inmunocompetentes e incluyen a *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii* y las especies de *Brucella*.

Todas las actividades de laboratorio, incluyendo el manejo de muestras clínicas y de cultivos microbianos, deben ser realizadas en cámaras de bioseguridad clase II o utilizando combinaciones de protección personal y contención física. El laboratorio debe estar físicamente separado de áreas abiertas al tráfico no restringido de personal de las instalaciones. El laboratorio debe tener un lavamanos colocado cerca de la salida y debe tener un dispositivo que permita abrir el grifo del lavamanos con el pie, con el codo o automáticamente.

Las ventanas deben ser selladas y las puertas deben tener un dispositivo para que se cierren por sí mismas. Debe tener un sistema de ventilación diseñado de tal manera que sea unidireccional e ingrese al laboratorio por el área de entrada.

### **Nivel de bioseguridad 4**

El nivel de bioseguridad 4 es el máximo nivel de contención física para el trabajo con microorganismos altamente infecciosos causantes de enfermedades exóticas, usualmente mortales, para las cuales no se tienen vacunas y tratamientos eficaces. Presenta únicamente agentes virales, como los virus Ebola y Hanta, pero no agentes bacterianos.

## 5. Procedimientos operativos a seguir en el laboratorio de bacteriología médica

Todo el personal debe utilizar siempre gabacha de manga larga hasta la altura de la rodilla y cerrada, esta debe ser considerada como material contaminado, lavarse las manos periódicamente; cada vez que entren en contacto con material infeccioso y siempre que se haga abandono del área del laboratorio. Se debe evitar tocarse, frotarse o rascarse mientras se permanezca en el laboratorio.

El material infeccioso, como muestras clínicas y cultivos microbianos, deben estar adecuadamente rotulados, indicando en forma precisa el contenido del recipiente y deben ser descontaminados antes de ser descartados. Todos los procedimientos este material deben ser realizados muy cuidadosamente de manera que se reduzca al máximo la formación de aerosoles. Los aerosoles pueden ser producto de la abertura de placas de petri o contenedores de material infeccioso, la inoculación de una muestra clínica o un cultivo, manipulación de pipetas, centrifugaciones o la esterilización a la llama de las asas bacteriológicas.

Es rotundamente prohibido pipetear con la boca y comer, beber, maquillarse o fumar en el área de laboratorio, así como almacenar o preparar alimentos para consumo humano. Igualmente, todos los artículos personales deben permanecer fuera del área de laboratorio.

Los accidentes en el laboratorio deben ser abordados con calma y ser debidamente reportados, en caso de ocurrir un derrame de material infeccioso, se debe despejar la zona y, usando guantes, se debe colocar un papel absorbente impregnado con un desinfectante (alcohol 70°-yodado) sobre el material. Si cae material contaminado sobre su piel, se debe proceder a desinfectar utilizando alcohol 70°-yodado, para luego lavar abundantemente con agua y jabón y aplicar nuevamente la desinfección. Si se presenta una contaminación de los ojos, proceda a enjuagar abundantemente con agua en la ducha facial respectiva. En caso de presentarse un incendio se debe utilizar un extintor para fuegos tipo ABC y si una persona en el laboratorio se está incendiando, se le debe cubrir con una gabacha mojada para apagar las llamas.

## 6. Manejo de los desechos infecciosos.

Los residuos generados en los laboratorios microbiológicos y clínicos presentan riesgos y dificultades especiales en su manejo debido, fundamentalmente, al carácter infeccioso de algunos de sus constituyentes. La heterogeneidad de su composición contribuye a acrecentar los riesgos, especialmente en el caso de desechos del laboratorio bacteriológico, donde existen cultivos con bacterias patógenas, objetos punzocortantes como agujas de jeringas, trozos de vidrio o plástico, sangre humana y sus derivados, residuos de muestras para cultivo y otros.

Los desechos deben ser manejados en una forma racional, dependiendo del nivel de bioseguridad del laboratorio, el tipo de material que constituye el desecho, el tipo de tratamiento aplicado al desecho y la forma en que los desechos tratados son eliminados de la institución. Por convenio se utiliza el color amarillo para designar el desecho infeccioso del nivel de bioseguridad 2, mientras que el color rojo se usa para designar el desecho infeccioso del nivel de bioseguridad 3.



Se debe contar con contenedores o recipientes de tamaño, forma y material adecuados, con el fin de asegurar un fácil manejo y limpieza. Se considera óptimo el uso de recipientes de metal, plástico o cartón, de estructura rígida y con tapa. En esos recipientes se colocan bolsas plásticas capaces de soportar el proceso de autoclavado. Los desechos deben ser tratados tan pronto como sea posible y si es necesario almacenarlos se debe disponer de un área de almacenamiento para desechos infecciosos de acceso restringido.

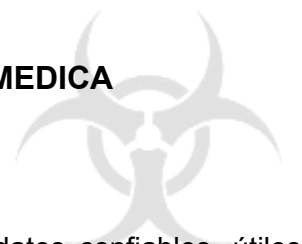
La esterilización de los desechos infecciosos mediante el uso de vapor saturado (autoclavado) es el método más comúnmente utilizado. La velocidad de destrucción depende del tipo de estructura a destruir (célula vegetativa o spora), del tiempo, la temperatura y de la presencia de humedad. Las condiciones más recomendadas se obtienen con un tratamiento de los desechos a 121°C (15-18 libras de presión) por un período de 20 a 30 minutos, dependiendo del volumen de los desechos infecciosos a esterilizar.

En el caso de desechos líquidos que han sido tratados se descartan directamente en los sistemas de desagüe a un tanque de depuración para seguir a los sistemas sanitarios convencionales. Los desechos sólidos procedentes de incineradores y autoclaves se deben descartar en basureros de metal o plástico rígido, provisto de tapa para su posterior transporte a rellenos sanitarios.

## 7. Bibliografía consultada.

- Barkley, W. M. & J. H. Richardson. 1994. Laboratory safety. En P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg (editores), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. pp. 715-734. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.
- Gershon, R. & I. F. Salkin. 1995. Biological safety. En H. D. Isenberg (editor), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 1. pp.14.1.1.-14.1.6. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.
- Gordon, J. G. 1995. Safety in waste management: a comprehensive plan for infectious waste management. En H. D. Isenber (editor), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 2. pp. 14.6.1.-14.6.6. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.
- Marsik, F. J. & G. A. Denys. 1995. Sterilization, decontamination, and disinfection procedures for the microbiology laboratory. En P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover (editores), *Manual of Clinical Microbiology*. 6<sup>th</sup> edition. pp. 86-98. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Pike, R. M. 1976. Laboratory acquired infections: summary and analysis of 3,921 cases. *Health Lab. Sci.* 13:105-114.
- Pike, R. M. 1978. Past and present hazards of working with infectious agents. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 102:333-336.
- Pike, R. M. 1979. Laboratory acquired infections: incidence, fatalities, cases and prevention. *Annu. Rev. Microbiol.* 33:41-66.

## II NORMAS DE CALIDAD EN BACTERIOLOGIA MEDICA



### 1. Introducción

El laboratorio de microbiología clínica opera para proporcionar datos confiables, útiles y oportunos al paciente o al médico responsable como una ayuda en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas. El microbiólogo clínico requiere, por lo tanto, de conocimientos de las diferentes entidades clínicas infecciosas, incluyendo aspectos etiológicos, epidemiológicos y clínicos, para poder tomar decisiones con respecto a la recolección, el transporte y el procesamiento de muestras clínicas, a la interpretación de los resultados de los análisis y a la elaboración de los respectivos reportes:

#### ***Evaluación clínica del paciente.***

- Examen médico

#### ***Recolección de la muestra.***

- Preparación del paciente.
- Procedimiento de recolección.
- Preparación de la muestra.

#### ***Transporte de la muestra.***

- Mensajero (distancia & tiempo).

#### ***Procesamiento de la muestra.***

- Documentación.
- Evaluación de la muestra.
- Preparación de frotis y cultivo.
- Identificación del microorganismo.
- Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

#### ***Interpretación de los resultados.***

- Análisis de datos.

#### ***Reporte de laboratorio.***

- Llamada telefónica.

El aseguramiento de la calidad se define con un sistema para mejorar continuamente la confiabilidad, eficiencia y utilización de productos y servicios. Para conseguirlo se realiza una estricta vigilancia de sus componentes y se implementa un método o estrategia para la corrección de errores cuando se identifica un rendimiento inaceptable. La calidad es

usualmente determinada mediante la especificación de indicadores de rendimiento y el establecimiento de límites de aceptación.

El aseguramiento de la calidad en microbiología clínica va desde la comprobación del funcionamiento del equipo y los reactivos hasta examinar el valor clínico de los servicios y la información suministrada. Depende de dos programas; el de mejoramiento de la calidad y el de control de calidad.

El programa de mejoramiento de calidad tiene como objetivo la prevención permanente de las deficiencias en un proceso antes de que se produzcan, y el programa de control de calidad es el proceso para la detección y corrección de errores luego de que han ocurrido, mediante el establecimiento de límites de ejecución aceptables.

## **2. Programa de control de calidad**

El factor más importante para un elevado nivel de calidad de trabajo en el laboratorio microbiológico es un personal altamente entrenado, que labore en un ambiente que promueva el trabajo en grupo y que se encuentre identificado con los objetivos del laboratorio y de su programa de aseguramiento de calidad. Para esto, se debe documentar que el personal haya completado los entrenamientos pre-analíticos, analíticos y post-analíticos en forma competente y que está capacitado para efectuar el trabajo que se le encomienda.

El manual de procedimientos debe incluir todos los procedimientos analíticos efectuados en el laboratorio de microbiología clínica con el fin de garantizar que todo el personal de laboratorio realice dichos procedimientos de la misma forma. Los procesos de certificación internacionales requieren que los manuales sean escritos en formatos específicos preestablecidos y que sean actualizados y revisados anualmente.

La solicitud del análisis, la manipulación de las muestras, y el reporte de los resultados deben ser documentados a lo largo de todo el proceso a través de procedimientos escritos que detallen la preparación del paciente, la recolección, la rotulación, la preservación y el transporte. Esta documentación ha de conformar los registros de laboratorio, al igual que los registros de control de calidad de reactivos, de medios de cultivo, de equipos y de sistemas comerciales miniaturizados y automatizados, así como los registros del personal de laboratorio.

Se debe documentar igualmente si la muestra no cumple con los criterios de aceptación del laboratorio, las razones por las cuales la muestra fue rechazada y, en los casos correspondientes, por qué la muestra fue analizada a pesar de no cumplir dichos criterios.

## **3. Control de calidad de medios de cultivo**

La calidad de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio microbiológico depende de una serie de factores que incluyen: la calidad de los ingredientes, la calidad del agua destilada o desionizada, el procedimiento seguido en su preparación y el rendimiento de los equipos necesarios para la preparación y el almacenamiento.

Los medios de cultivo pueden ser preparados a partir de ingredientes individuales o a partir de medios deshidratados comerciales que deben ser almacenados correctamente, según las indicaciones del fabricante. Para el pesado de los medios de cultivo deshidratado se requiere

de balanzas granatarias ( $\pm 0.1$  g) en perfecto estado. El agua para disolver los ingredientes o los medios de cultivo deshidratados debe ser destilada o desionizada y ser medida en cristalería en perfecto estado y completamente limpia.

Una vez disuelto el medio de cultivo se debe ajustar el pH si es necesario, ajustado el pH, el medio de cultivo debe ser calentado en un mechero Bunsen o en una plantilla de gas para disolver el agar agitando constantemente. Durante este calentamiento se produce evaporación del agua en el medio por lo que se recomienda agregar un volumen adicional de agua de aproximadamente 5% del volumen del medio de cultivo.

Para el control de calidad se debe tomar en cuenta el aspecto general del medio preparado, la nivelación en la placa de Petri, la cantidad de agar (se recomienda añadir un volumen de 15-20 ml de medio a las placas de Petri y a los tubos un volumen de 3-5 ml) y la proporción inclinado:fondo de los tubos.

La esterilidad se debe evaluar incubando el 5% del material a la temperatura de crecimiento de los microorganismos que serán crecidos en dicho medio con una atmósfera adecuada y por un período de tiempo determinado. La funcionalidad del medio se debe demostrar con el crecimiento o la inhibición de las cepas deseadas y con las reacciones físicas o bioquímicas que deben dar con bacterias de referencia.

#### **4. Control de calidad de tinciones**

Todas las tinciones deberían probarse a intervalos recomendados por su habilidad para distinguir organismos positivos o negativos, y los resultados deberían documentarse. Se debe revisar diariamente la apariencia de los reactivos, si las suspensiones han precipitado o se observan cristales.

#### **5. Control de calidad de reactivos**

Al igual que todos los productos que se utilizan en pruebas químicas y bioquímicas, los reactivos de identificación bacteriana, ya sean adquiridos mediante compra o preparados en el laboratorio, deben estar claramente rotulados, conteniendo la siguiente información: la fecha en que fueron abiertos por primera vez, la fecha de expiración, concentración y requerimientos de almacenamiento. Para los reactivos preparados en el laboratorio, la etiqueta debe contener además; volumen preparado, fuente de origen, número de lote de la fuente y las iniciales de la persona que los preparó.

Los productos utilizados para detectar metabolitos bacterianos deben ser probados con cepas productoras y no productoras reconocidas. Los reactivos químicos que pueden generar reacciones similares no son aceptables en sustitución de cepas bacterianas apropiadas. Los registros deben reflejar los resultados de estas pruebas de control de calidad al grado necesario para determinar la conveniencia de los productos para su uso en el laboratorio. Las siguientes son observaciones y recomendaciones acerca de las pruebas específicas.

Prueba de rojo de metilo.

- El rojo de metilo es una prueba de cambio de pH en el medio, por la utilización fermentativa de la glucosa del medio, y muestra la reacción opuesta a la exhibida por la prueba de Voges-

Proskauer. Debido a la naturaleza sutil de la reacción, tanto el medio como los reactivos deben ser cuidadosamente controlados.

- La adición del indicador rojo de metilo debe hacerse lentamente sobre el caldo incubado por 48 h, no debe agitarse y se debe leer inmediatamente. Si el indicador se mantiene rojo brillante la prueba es positiva, el color rojizo-naranja indica una prueba dudosa, y el color amarillo una prueba negativa. En caso de pruebas dudosas, debe repetirse el procedimiento completo.

Prueba de Voges-Proskauer.

- Esta prueba mide la capacidad de las bacterias de producir acetilmetilcarbinol y otros productos neutros a partir de glucosa por vías fermentativas. Estas sustancias producen un color rosa intenso a rojo en medio básico y con alta aeración, por lo que es importante la agitación vigorosa después de agregar en orden los reactivos.
- La modificación de Coblenz o de O'Meara incluyen 0.3% de creatina en la solución de KOH, lo cual intensifica el color formado, pero disminuye la estabilidad del reactivo.

Prueba de indol (reactivos de Ehrlich y de Kovacs).

- Estos reactivos se deben guardar a 4°C y en botella ámbar, debido a que su estabilidad es variable. Es recomendable revisarlos cada semana usando cepas de control positivas y negativas. Los reactivos deberán descartarse cuando el control positivo produzca un color rosa débil o negativo.
- El desarrollo de color en los reactivos (amarillo o café) es indicativo de pérdida de sensibilidad y debe descartarse.

Prueba de reducción de nitratos.

- En vista de que se ha demostrado que la alfa naftilamina es un cancerígeno, se recomienda usar el N-N-dimetil-alfa-naftilamina al 0.6%. Sin embargo, dada la similitud estructural de ambos compuestos, se debe evitar al máximo la formación de aerosoles, pipetear con la boca y el contacto con la piel.

Prueba de catalasa.

- Para esta prueba se utiliza peróxido de hidrógeno al 3%, el cual debe almacenarse en refrigeración a 4°C y en botella ámbar. Los eritrocitos poseen actividad de catalasa por lo que su presencia pueden ocasionar falsos positivos, pero también se puede utilizar sangre como control positivo del reactivo, en ausencia de una cepa de *Staphylococcus*. Esta prueba se puede realizar en lámina, en placa o en agar inclinado.

Prueba de coagulasa.

- Esta prueba se puede realizar en lámina o en tubo y se debe usar plasma fresco de conejo o de sangre humana no citratada. Debe utilizarse siempre un control positivo y uno negativo con cada corrida de pruebas en paralelo. La mayoría de cepas coagulasa-positiva producen un coágulo en las primeras 4 horas. Los falsos positivos pueden ocurrir con cultivos mixtos o con cepas de *Pseudomonas* spp., pero su mecanismo de coagulación es diferente.
- Se debe tener presente que el medio de cultivo que se esté usando esté libre de sal para evitar falsos positivos por autoaglutinación.
- El plasma debe someterse a un control de esterilidad mediante la incubación por 24 horas a 35°C.

- Para el control de coagulación se agrega una gota de solución de cloruro de calcio al 5% a 0.5 ml de plasma, el cual debe coagular en un período de un minuto. Este tipo de control se debe realizar con cada lote de plasma y cada vez que se realice la prueba.
- Si se utiliza plasma citratado se debe agregar 5 U heparina/ml para eliminar falsos positivos, ya que microorganismos que utilizan citrato causan coagulación del plasma al consumirlo.
- Si el cultivo a probar tiene más de 24 horas o es escaso se puede obtener una prueba positiva débil.
- El plasma se puede congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  para así tener un stock disponible. Asimismo, las casas comerciales ofrecen al mercado plasmas liofilizados lo que facilita su almacenamiento.

#### Prueba de Oxidasa.

- Esta prueba detecta la presencia de la enzima citocromo C oxidasa, y se utiliza en la identificación presuntiva de especies de *Neisseria*, en la caracterización inicial de bacilos Gram-negativos y en la diferenciación de estafilococos y micrococcos.
- Los procedimientos incluyen desde inundar las placas de agar (con colonias sospechosas de *Neisseria*) con el reactivo, hasta la prueba rápida en papel.
- Los reactivos de oxidasa se pueden preparar a partir del sustrato en polvo o en pastillas, o bien pueden estar impregnados en un soporte inerte, listo para usar.
- El reactivo de oxidasa de Kovacs para Gram-negativos (0.5 a 1% de dihidrocloruro de tetrametil-p-fenildiamina en agua destilada) debe prepararse el día que se va a utilizar, mientras que el reactivo para cocos Gram-positivos (6% TMPD en dimetilsulfóxido) es estable a temperatura ambiente por varias semanas.

#### Discos de Bacitracina.

- Los discos impregnados con 0.04 unidades de Bacitracina son utilizados en la diferenciación presuntiva de *Streptococcus* beta hemolíticos del grupo A de Lancefield (susceptibles) de otros *Streptococcus* beta hemolíticos. También son útiles en la diferenciación de los géneros de *Micrococcus* (sensibles, con un halo generalmente mayor a 10 mm) y *Staphylococcus* sp. (resistentes).
- En el caso de los estreptococos debe utilizarse un inóculo denso en el agar sangre para tener un buen crecimiento de la bacteria. En el caso de estafilococos la prueba se realiza sobre una placa de agar Mueller-Hinton, de forma similar a la pruebas de difusión en agar para susceptibilidad a antibióticos.
- Un 10 a 20% de los estreptococos de los grupos C y G son susceptibles a bacitracina.
- Algunos *Streptococcus* alfa hemolíticos pueden resultar sensibles por lo que no se debe confundir la hemólisis.
- Los discos deben mantenerse a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su fecha de vencimiento.

#### Discos de Optochin.

- Estos discos se utilizan para la diferenciación del *Streptococcus pneumoniae* de otros estreptococos alfa-hemolíticos. Los resultados que pueden presentarse son los siguientes:
- Si se usan discos de 6 mm el halo de inhibición debe tener un diámetro mínimo de 14 mm y los discos de 10 mm este halo debe tener un diámetro mínimo de 16 mm.
- La incubación debe hacerse a  $35^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera enriquecida con  $\text{CO}_2$ . Los estreptococos no crecen tan bien en atmósfera normal, por lo que se pueden presentar halos más grandes.
- Estos discos deben guardarse a  $4^{\circ}\text{C}$ , realizando un control de calidad con cada lote y una vez por semana. Los discos se eliminarán cuando los controles no cumplan los requisitos establecidos o cuando la fecha de vencimiento así lo indique.

## 6. Control de calidad de sueros

Los tests serológicos son herramientas valiosas para identificar agentes patogénicos de interés clínico. Estas pruebas se utilizan para identificar y tipificar serológicamente microorganismos, demostrar la presencia de anticuerpos en suero y cuantificar la cantidad de anticuerpos presentes. Existe una gran variedad de antisueros para identificación de bacterias de importancia clínica, tales como *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Brucella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* H, *Salmonella* O, *Shigella*, y *Vibrio cholerae*. Las principales presentaciones de estos antisueros son como pruebas de aglutinación de partículas y como técnicas con anticuerpos marcados, principalmente con fluorocromos o enzimas. En el caso de los anticuerpos marcados, algunos procedimientos permiten la detección presuntiva del agente en muestras clínicas, además de la confirmación inicial de cultivos sospechosos. Estas pruebas complementan, no sustituyen, a las técnicas bacteriológicas convencionales.

Dentro de las principales recomendaciones con respecto al control de calidad se pueden destacar las siguientes:

- Se deben seguir estrictamente las instrucciones del fabricante, tanto en la preparación de materiales como en el procedimiento y control de calidad específicos.
- Para una mejor interpretación de las pruebas, se debe incluir siempre controles positivos como negativos, ya sea como sueros control, o bien, antígenos provenientes de cepas estándar especificadas por el fabricante previamente identificadas en el laboratorio.
- Es de suma importancia que el usuario de estos reactivos esté familiarizado con las técnicas inmunológicas, particularmente técnicas de microscopía de fluorescencia y ensayos inmunoenzimáticos.
- Los antisueros son estables en su forma liofilizada a 4°C hasta su fecha de vencimiento. Una vez resuspendidos deben guardarse a 4°C (no congelar) hasta la fecha de vencimiento especificada en el procedimiento.
- El material que se utiliza para las reacciones serológicas (portaobjetos, pipetas de vidrio, etc.) debe estar escrupulosamente limpio y separado, si es posible, de otros materiales de uso rutinario.
- Todas las soluciones (suspensiones de antisueros, antígenos, diluentes) deben chequearse por su esterilidad y presencia de precipitados insolubles.
- Registrar efectivamente la calidad de los reactivos en formularios, al inicio de cada lote nuevo y una vez al mes con controles positivos y negativos.

## 7. Control de calidad del equipo de laboratorio

Para llevar a cabo el mejoramiento y control de calidad de los equipos del laboratorio se debe contar con una guía general, protocolizada, que incluya:

- Descripción del instrumento, principio de operación y su función en el laboratorio.
- Cuidados en el uso del equipo así como los requisitos que debe tener el lugar donde se va a instalar el mismo.
- Suministros y reactivos para la operación y mantenimiento.

- Procedimientos de calibración inicial.
- Procedimientos de control de calidad de rutina.
- Recomendaciones para su uso en la rutina.
- Tipos de problemas que se pudieran presentar.
- Referencias y lecturas complementarias.
- Ejemplos de hojas de registro de control de calidad o diagramas.



Control de la temperatura de funcionamiento de los equipos.

- Usar un termómetro calibrado cuando la temperatura sea crítica para el funcionamiento adecuado del instrumento o del procedimiento de la técnica.
- Marcar el termómetro (con un marcador de vidrio o lápiz de cera) arriba y abajo del ámbito crítico de temperatura para facilitar la lectura
- Colocar el termómetro en varios lugares del aparato para documentar fluctuaciones y determinar criterios aceptables de funcionamiento.
- Si el instrumento de temperatura controlada no se usa diariamente, registrar la temperatura cada vez que se use el equipo.
- Tolerancias recomendadas:
  1. Incubadoras:  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  a menos que se requiera de una temperatura específica.
  2. Baños maría y bloques térmicos:  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  3. Refrigeradores: 4 a  $8^{\circ}\text{C}$ .
  4. Congeladores estándar ( $-20^{\circ}\text{C}$ ):  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ .
  5. Congeladores de temperatura ultra baja ( $-70^{\circ}\text{C}$ ):  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ .

### Incubadora

- Una incubadora es una cabina o un cuarto aislado con estantes ajustables que mantiene una temperatura constante, usualmente arriba de la temperatura ambiente. El aparato más simple consiste de un elemento productor de calor y un termostato que mantiene la temperatura seleccionada. Los más complejos tienen control automático de temperatura, indicadores de temperatura,  $\text{CO}_2$ , humedad y alarmas para variaciones de los parámetros óptimos. Como mínimo se recomienda una incubadora con dos termostatos (regulador y de seguridad), para evitar que si falla el termostato regulador se produzcan aumentos incontrolados de temperatura.
- En el laboratorio de microbiología la incubadora se utiliza para el crecimiento de microorganismos a una temperatura constante y apropiada. Al menos dos incubadoras son necesarias en un laboratorio de rutina de microbiología clínica, una a  $35^{\circ}\text{C}$  y otra a  $42^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  se usa para la mayoría de cultivos bacteriológicos, las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, algunas reacciones bioquímicas, kits de identificación (p. ej. API20E), tinciones fluorescentes y ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs), mientras que la de  $42^{\circ}\text{C}$  se necesita para el aislamiento de *Campylobacter* sp. y para la prueba de crecimiento a  $42^{\circ}\text{C}$  de *Pseudomonas*. Algunos kits de identificación de levaduras y bacterias no fermentadoras requieren de incubación a  $30^{\circ}\text{C}$ .
- En un laboratorio de microbiología clínica se debería tener al menos una incubadora que ofrezca la condiciones necesarias para la recuperación de microorganismos patógenos fastidiosos como por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae*, este aparato debe indicar la temperatura, atmósfera de  $\text{CO}_2$  y humedad relativa, las cuales deben ser de  $35^{\circ}\text{C}$  con un 40-50% de humedad y una atmósfera de  $\text{CO}_2$  de 5 a 7 %.
- No se debe dejar la puerta de la incubadora abierta más allá de lo necesario, o bien, la temperatura no debe caer más de  $5^{\circ}\text{C}$  cuando se tenga abierta.



- La incubadora debe colocarse en un lugar bien nivelado, con suficiente espacio a cada lado para permitir que las puertas abran completamente y que el aire circule alrededor del aparato.
- La conexión eléctrica debe estar conectada a tierra y a una fuente de poder de emergencia. No usar extensiones eléctricas.
- La incubadora debe colocarse lejos de radiadores, aparatos de aire acondicionado y corrientes de aire. La temperatura ambiente debe ser al menos 5°C por debajo de la temperatura deseada del aparato para su operación eficiente.
- Llenar una bandeja con aproximadamente 1 litro de agua con un agente antimicrobiano (p.ej. cristal violeta o un antifúngico) y colocarla en el incubador para generar humedad.
- Permitir al menos 3 cm de espacio entre los objetos (pilas de placas, botellas, etc.) dentro de la incubadora. Para evitar derrames, no apilar más de cinco placas de Petri a menos que estén sujetas de alguna manera.

Leer y registrar diariamente la temperatura y los niveles de CO<sub>2</sub>.

- Cada tres días hacer subcultivos de *Neisseria gonorrhoeae* y revisar su crecimiento para incubadoras a 35°C y hacer subcultivos de *Campylobacter jejuni* y revisar su crecimiento para incubadoras a 42°C.

### Microscopio de luz visible

- El microscopio debe colocarse en una superficie nivelada donde no alcance la vibración de centrifugas y otros equipos.
- Colocar el microscopio en un lugar donde no sea movido frecuentemente.
- Usar una silla ajustable para permitir que diferentes personas utilicen confortablemente el microscopio.
- Remover el aceite de inmersión de los lentes después de usarlo.
- Usar solamente papel para lentes. Los pañuelos faciales pueden tener fibras que rayan los lentes.
- Cubrir el microscopio cuando no está en uso.
- Alinear el microscopio con cada uso (iluminación de Koehler) para una mejor calidad de imagen.
- No tocar nunca los bulbos con los dedos, solamente con papel de lentes para cambiarlos.
- Cargar el microscopio siempre con una mano en la base y la otra en el brazo, nunca levantarlo del revólver.
- Mantener el frasco con aceite de inmersión tapado y libre de polvo.
- No intercambiar objetivos entre microscopios a menos que se conozcan las especificaciones mecánicas de longitud o que el microscopio ha sido calibrado antes con los objetivos a intercambiar.
- Al final de cada día proceda a limpiar el aceite del objetivo de inmersión, el condensador y el carro del microscopio, desconectar de la fuente de electricidad y cubrir el microscopio.

### 8. Procesos de evaluación externa

Los laboratorios de microbiología clínica pueden participar en programas de control de calidad externos, los cuales consisten en el análisis de cinco muestras clínicas, reales o simuladas, o cultivos mixtos o puros de microorganismos de referencia, tres veces por año, con el objeto de:

- Evaluar los procedimientos de análisis efectuados en el laboratorio microbiológico.

- Permitir la comparación de los procedimientos de análisis efectuados por diferentes laboratorios microbiológicos, por nivel de especialización, pertenecientes a un mismo sistema de atención de salud.

Debe ser claro para los administradores y para todo el personal del laboratorio que el análisis de las muestras enviadas para el programa de control de calidad externo deben ser analizadas exactamente en la misma forma que se analiza una muestra clínica de rutina, incluyendo los procedimientos de análisis y el personal que analiza la muestra, y no deben merecer atenciones especiales. Dentro de los parámetros que son evaluados se incluyen:

- El aislamiento y la identificación de los microorganismos.
- Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.
- El tiempo total del procedimiento.
- La calidad del reporte final.

### 9. Bibliografía consultada.

- Schifman, R. B. 1995. Quality assessment and improvement (Quality Assurance). En Isenberg, H. D. (editor), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 2. pp.13.1.1.-13.1.29. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.
- Sewell, D. L. 1995. Quality control. En Isenberg, H. D. (editor), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 2. pp. 13.2.1.-13.2.35. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.
- Sewell, D. L. & R. B. Schifman. 1995. Quality assurance: quality improvement, quality control, and test validation. En Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover (editores), *Manual of Clinical Microbiology*, 6<sup>th</sup> edition. pp. 55-66. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.

## III ASPECTOS BASICOS EN BACTERIOLOGIA

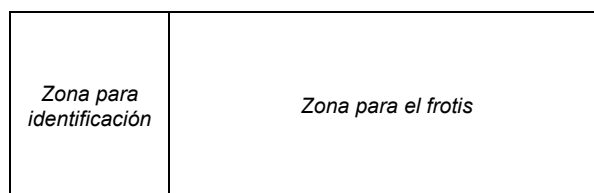


### 1. Introducción

Existen una serie de procedimientos básicos en bacteriología médica, incluyendo preparación de frotis, tinción de Gram y rayado de placas para aislamiento que deben ser técnicamente dominados. Estos procedimientos son fundamentales para el estudio de los diferentes grupos bacterianos así como para el aislamiento y la identificación de bacterias de importancia médica a partir de diferentes tipos de muestras clínicas.

### 2. Recomendaciones para la preparación de frotis

Es importante utilizar láminas limpias y en perfecto estado, libre de rayones y de manchas, deben ser previamente pasadas por la llama del mechero para eliminar trazas de grasa y no se deben tocar con las yemas de los dedos. Las láminas se deben identificar de manera inequívoca con un lápiz de cera o con marcador de tinta indeleble para evitar confusiones.



El frotis debe ser delgado, translúcido y homogéneo para que, durante el proceso de tinción, reciba en toda su superficie el mismo tratamiento con las diferentes sustancias químicas y se debe usar para la preparación la técnica aséptica. Las muestras clínicas no deben ser diluidas con agua o con algún otro diluyente para la preparación del frotis y si la muestra contiene mucho material se reduce la cantidad de muestra o se aumenta la zona del frotis.

La preparación se debe secar al aire antes de fijarla a la llama y al fijarla se debe tener cuidado de no calentar demasiado porque se alteran las características tintoriales del material contenido en la muestra, igualmente se debe permitir que la lámina se enfríe antes de hacer la tinción.

Alternativamente los frotis se pueden fijar utilizando metanol. Para ello, se coloca la lámina sobre una superficie nivelada. Con cuidado se cubre el frotis completamente con metanol absoluto y se deja secar al aire hasta que el metanol se haya evaporado.

### 3. Tinción de gram

La tinción de Gram es muy importante en el trabajo de laboratorio de Bacteriología Médica. El frotis de una muestra clínica teñida al Gram es el primer paso en el diagnóstico de una infección bacteriana.

- **Técnica de Kopeloff Modificada**

- Una vez preparado el frotis, se cubre con cristal violeta, se adicionan 2 ó 3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio, se mezcla moviendo cuidadosamente la lámina y se deja en reposo por 1 minuto.
- Se lava la preparación con agua, se escurre, se cubre con solución de lugol y se deja en reposo por 2 minutos.
- Se lava con agua, se escurre y se decolora con la solución de etanol-acetona hasta que casi no libere color violeta. Se lava con agua inmediatamente.
- Se aplica solución de safranina por 1 minuto, se lava con agua el portaobjetos y se deja secar al aire. Alternativamente se puede aplicar una solución de fucsina como colorante de contraste.
- Se observa al microscopio a 1000X.

#### 4. Rayado de placas

La técnica del rayado de placas consiste en la distribución, utilizando el asa bacteriológica, de un inóculo de bacterias sobre una superficie de agar para obtener colonias separadas. En esta es importante que se siga cuidadosamente la técnica aséptica y observar que las placas a utilizar no contengan ninguna colonia contaminante, burbujas, grumos o agua de condensación.

La calidad del rayado depende directamente de la cantidad de bacterias en la muestra y en el inóculo que se siembra según la cantidad de bacterias de la que se parte. Se debe procurar la utilización al máximo de la superficie del agar y realizar los trazos lo más seguidos posible pero sin que se traslapen.

- Mentalmente se divide la placa en tres secciones como se muestra en la figura 2. En la zona 1 se coloca la muestra con un hisopo o con el asa bacteriológica y se distribuye homogéneamente el inóculo en toda la zona 1. Se esteriliza el asa.
- Se distribuye una pequeña porción del material de la zona 1 hacia la zona 2 de la placa ingresando unas 3 ó 4 veces con el asa bacteriológica y se repite el procedimiento para distribuir el material de la zona 2 hacia la zona 3 tratando de abarcar la mayor parte de la superficie disponible.

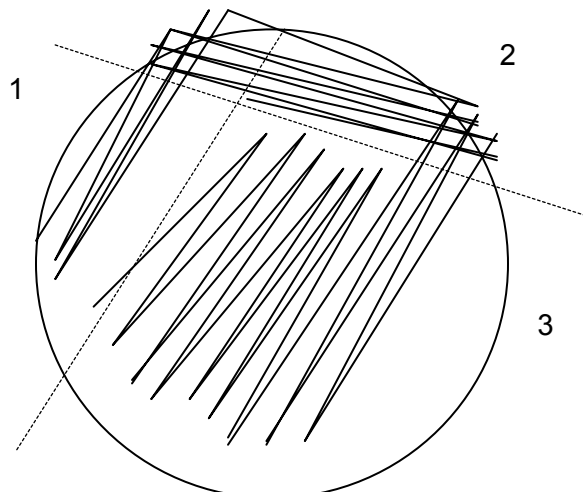
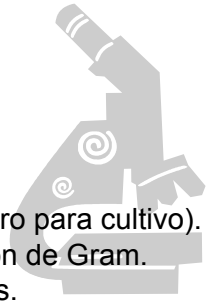


Fig. 2 Técnica de rayado de placas

## 5. Cronograma de actividades

### DIA 1

- Entrega de cultivo mixto de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Entrega de muestra de heces.
- Recolección de muestra de orofaringe (dos hisopados: uno para frotis y el otro para cultivo).
- A partir del cultivo mixto y de cada una de las muestras realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica observada en cada una de las muestras.
- Sembrar el cultivo mixto y cada una de las muestras por rayado, con el objeto de aislar al menos 25-30 colonias, en placas de: agar Sangre, agar MacConkey y agar Manitol Sal
- Incubar las placas a 35 °C por 24 horas. Las placas de Agar Sangre deben ser colocadas en jarras con candela para crear una atmósfera capnofílica.



### DIA 2

- Describir la morfología colonial de cada bacteria en los medios sembrados y considerando los siguientes aspectos:

**Tamaño:** (diámetro en mm) de la colonia.

**Forma:** puntiforme, circular, filamentosa, irregular, etc.

**Elevación:** plana, elevada, convexa, pulvinada o umbonada.

**Margen:** entero, ondulado, lobulado, dentado, filamentoso o encrespado.

**Tipo de superficie:** lisa, rugosa o granular.

**Características ópticas:** opaca o translúcida.

**Producción de pigmentos.**

- A partir de cada uno de los diferentes morfotipos coloniales observados en los distintos medios preparar un frotis y teñirlo por Gram. Hacer la correspondiente observación de la morfología microscópica.
- Inocular aquellos morfotipos coloniales que correlacionen con una morfología microscópica de bacilos Gram-negativos en Agar TSI inclinado utilizando el asa en punta. Inocular el medio hasta el fondo del tubo y luego en el inclinado. Sustituir el tapón de hule del tubo con el agar TSI por papel aluminio e incubar a 35°C por 24 horas.

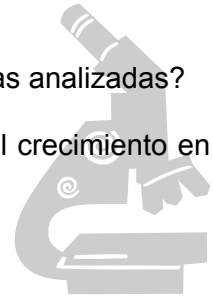
### DIA 3

- Realizar la lectura del TSI.

## 6. Discusión de resultados

1. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram?
2. ¿Cuáles son las características nutricionales de los tres medios utilizados?
3. ¿Cuál es el fundamento metabólico que explica el hecho de que algunas bacterias sean capnofílicas (requieren una atmósfera con una concentración aumentada [5-10%] de CO<sub>2</sub>)?

4. ¿Cuáles de los medios utilizados son selectivos y por qué?
5. ¿Cómo se evidencia la selectividad de los medios con respecto a las muestras analizadas?
6. ¿Cuál es la relación entre la observación de la morfología microscópica y el crecimiento en cada uno de los medios utilizados para cada una de las muestras estudiadas?
7. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de TSI?
8. ¿Cuáles reacciones se observan en el Agar TSI con las bacterias inoculadas?



## IV ENTEROBACTERIACEAE



### 1. Generalidades de la familia Enterobacteriaceae

Las especies de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos que no forman esporas, móviles por flagelos peritricos o no móviles, crecen aeróbica o anaeróbicamente, la glucosa es metabolizada de forma fermentativa, producen la enzima catalasa, no tienen actividad de citocromo C oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. De modo típico estos microorganismos producen en agar sangre colonias relativamente grandes, de color gris opaco, secas. La hemólisis en agar sangre es variable y no es característica de ningún género o grupo en particular. La apariencia mucóide de las colonias sugieren la presencia de una cápsula de polisacáridos extracelulares como en el caso de *Klebsiella pneumoniae*. Las colonias que aparecen como una película delgada o como ondas (swarming) sugieren que el microorganismo es móvil y probablemente sea una especie de *Proteus*.

Las especies de la familia Enterobacteriaceae están ampliamente distribuidas en plantas, suelos, aguas e intestino de animales y humanos y su diferenciación se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Los sustratos con los cuales pueden reaccionar estas enzimas se incorporan al medio de cultivo junto con indicadores que detectan la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos, estableciéndose así un perfil bioquímico para hacer la identificación de especie.

Estos microorganismos están asociados a diferentes cuadros clínicos en seres humanos, incluyendo la formación de abscesos, neumonías, meningitis, septicemias, infecciones de tracto urinario e intestinal, entre otros. Las bacterias de esta familia forman la mayor parte de la flora normal intestinal y muchas de las especies son importantes en las infecciones nosocomiales.

### 2. Morfología colonial en medios de aislamiento primario

A continuación se describe la morfología colonial de algunas especies observada en medios selectivos y diferenciales.

- **Agar bismuto-sulfito.** Este medio es utilizado para el aislamiento de *Salmonella typhi* mostrando a las 18 horas de incubación colonias negras con brillo metálico a su alrededor y después de 48 horas son completamente negras. Otras especies de *Salmonella* a las 18 horas se observan de color verde-negruzco y después de 48 horas son uniformemente negras. Las demás enterobacterias son de color verde-café sin brillo metálico.
- **Agar Hektoen.** Se usa en el aislamiento de *Shigella* spp. y de *Salmonella* spp., las cuales presentan colonias verdes y colonias azul-verdoso con o sin centro negro, respectivamente. Los demás coliformes presentan colonias rosado-salmón. Algunas especies de *Proteus* pueden ser semejantes a *Salmonella* o a *Shigella*.

- **Agar Salmonella-Shigella.** Se utiliza principalmente para aislar bacterias lactosa-negativa como *Salmonella* y *Shigella*, que provienen de aguas, alimentos y muestras clínicas. *Salmonella* presenta colonias translúcidas con una zona negra en el centro, mientras que *Shigella* presenta colonias translúcidas. Especies de la familia Enterobacteriaceae lactosa-positivas, como *Escherichia coli*, presentan colonias rosadas.
- **Agar Tergitol 7.** Este medio permite también diferenciar especies fermentadoras de la lactosa de las especies no fermentadoras. *Salmonella* y *Shigella* presentan colonias rojas, mientras que *Escherichia coli* y *Klebsiella* producen colonias amarillas y verde-amarillo, respectivamente.
- **Agar MacConkey.** Igual al anterior separa las bacterias fermentadoras de la lactosa. *Escherichia coli* produce colonias rosadas, mientras que *Salmonella* y *Shigella* producen colonias translúcidas.
- **Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) de Levine.** Permite la diferenciación de especies fermentadoras de la lactosa. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* presentan colonias que varían de púrpura a verde metálico. *Shigella* y *Salmonella* producen colonias translúcidas.

### 3. Pruebas bioquímicas para identificación de géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae

- **Agar TSI.** Es un medio de cultivo diferencial basado en la capacidad de los bacilos Gram negativos de fermentar carbohidratos, producir H<sub>2</sub>S y producir gas.
- **Prueba de orto-nitrofenil-β-galactopiranosido (ONPG).** Esta prueba detecta la producción de la enzima β-galactosidasa y permite diferenciar organismos de lenta utilización de la lactosa de aquellos que no la utilizan. La enzima β-galactosidasa es codificada por el gen *lacZ* del operón lactosa, el cual es inducido en presencia de lactosa y ausencia de glucosa. Por lo tanto, se requiere que las bacterias hayan sido crecidas en un medio con lactosa como el Agar TSI o el Agar MacConkey.
- **Prueba de movilidad.** Para determinar la movilidad de los bacilos fermentadores.
- **Prueba de gelatinasa.** Determina la producción de la enzima gelatinasa, la cual produce la hidrólisis de la gelatina.
- **Prueba de rojo de metilo (RM).** Identifica especies de bacterias que producen ácidos fuertes a partir de glucosa.
- **Prueba de Voges-Proskauer (VP).** Esta prueba detecta la producción de acetilmetilcarbinol (acetoína), el cual se convierte a diacetilo en presencia de KOH y O<sub>2</sub> atmosférico. El diacetilo es convertido posteriormente en un complejo rojo en presencia de α-naftol y creatina. La producción de acetoína es una vía alternativa del metabolismo del ácido pirúvico, donde se producen cantidades pequeñas de ácidos mixtos que pueden ser insuficientes para dar una prueba de RM positiva. Por este motivo, la mayoría de las especies de la familia Enterobacteriaceae son VP positivo y RM negativo y viceversa.
- **Prueba de fenilalanina desaminasa.** La determinación de la enzima fenilalanina desaminasa es útil en la diferenciación inicial de especies de: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* de otros bacilos Gram negativos.



- **Producción de descarboxilasas y de dehidrolasas de aminoácidos.** Muchas especies de bacterias poseen enzimas capaces de descarboxilar o de hidrolizar aminoácidos específicos, como arginina, lisina y ornitina, en un determinado medio de prueba, con lo cual liberan aminas de reacción alcalina y CO<sub>2</sub>.
- **Prueba de ureasa.** Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan urea liberando amoníaco lo cual produce un cambio de color rojo en el medio. El agar urea de Christensen permite la detección de menores cantidades de amoníaco por lo que aquellos organismos que producen menores cantidades de ureasa se evalúan con este método, incluyendo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Brucella* y *Bordetella bronchiseptica*.
- **Producción de indol.** El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptofano. Para su detección la bacteria es cultivada en caldo triptona y posteriormente se utiliza el reactivo de Ehrlich, el cual es más sensible que el reactivo de Kovacs cuando se evalúan bacilos no fermentadores o anaerobios cuya producción de indol es mínima.
- **Utilización de citrato.** Esta prueba tiene como objetivo determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento.
- **Utilización de malonato.** Determina la capacidad de algunas bacterias de utilizar el malonato como fuente de carbono y energía.
- **Prueba de reducción de nitratos.** Determina la capacidad de reducir el nitrato a nitrito o gas. Es útil en la identificación de la familia Enterobacteriaceae y en la diferenciación de especies de muchos otros grupos de microorganismos.
- **Prueba de fermentación de carbohidratos.** Se recomienda el uso del caldo base púrpura de bromocresol conteniendo un determinado sustrato a una concentración del 1% para la determinación de la fermentación de carbohidratos y alcoholes para especies de la familia Enterobacteriaceae.

## 4. Clasificación por especie de los géneros clínicamente más importantes de la familia Enterobacteriaceae

Cuadro 1. Características fenotípicas de la familia Enterobacteriaceae<sup>1</sup>.

Organismo	Pruebas bioquímicas <sup>2</sup>																		
	IND	RM	VP	CIT	H <sub>2</sub> S TSI	URE	FEN	LIS	ARG	ORN	MOV	SOR	LAC	SAC	MAN	ADO	ARA	MAL	MLN
<i>Citrobacter</i>																			
<i>C. freundii</i>	33	100	0	78	78	44	0	0	67	0	89	100	78	89	100	0	100	100	11
<i>C. koserii</i> <sup>3</sup>	99	100	0	99	0	75	0	0	80	99	95	99	50	40	99	99	99	100	95
<i>C. amalonoticus</i>	100	100	0	95	5	85	0	0	85	95	95	99	35	9	100	0	99	99	1
<i>Edwardsiella</i>																			
<i>E. tarda</i>	99	100	0	1	100	0	0	100	0	100	98	0	0	0	0	0	9	100	0
<i>Enterobacter</i>																			
<i>E. aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	100	95	100	100	98	100	99	95
<i>E. cloacae</i>	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	95	93	97	100	25	100	100	75
<i>E. gergoviae</i>	0	5	100	99	0	93	0	90	0	100	90	0	55	98	99	0	99	100	96
<i>E. taylorae</i>	0	5	100	100	0	1	0	0	94	99	99	1	10	0	100	0	100	99	100
<i>E. agglomerans</i> <sup>4</sup>	20	50	70	50	0	20	20	0	0	0	85	30	40	75	100	7	95	89	65
<i>E. sakazakii</i>	11	5	100	99	0	1	50	0	99	91	96	0	99	100	100	0	100	100	18
<i>Escherichia</i>																			
<i>E. coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	94	95	50	98	5	99	95	0
<i>E. coli (inactiva)</i>	80	95	0	1	1	1	0	40	3	20	5	75	25	15	93	3	85	80	0
<i>E. hermannii</i>	99	100	0	1	0	0	0	6	0	100	99	0	45	45	100	0	100	100	0
<i>Shigella</i> grupos A, B, C <sup>5</sup>	50	100	0	0	0	0	0	0	5	1	0	30	0	0	93	0	60	30	0
<i>S. sonnei</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	2	2	1	99	0	95	90	0
<i>Ewingella</i>																			
<i>E. americana</i>	0	84	95	95	0	0	0	0	0	0	60	0	70	0	100	0	0	16	0
<i>Klebsiella</i>																			
<i>K. pneumoniae</i>	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	99	98	99	99	90	99	98	93
<i>K. oxytoca</i>	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	99	100	100	99	99	98	100	98
<i>K. ozaenae</i>	0	98	0	30				40	6	3	0	65	30	20	100	97	98	95	3
<i>K. rhinoscleromatis</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	75	100	100	100	100	95
<i>Morganella</i>																			
<i>M. morganii</i>	95	95	0	0	20	95	95	1	0	95	95	0	1	0	0				1

Cuadro 1. (continuación)

Organismo	Pruebas bioquímicas																		
	IND	RM	VP	CIT	H <sub>2</sub> S TSI	URE	FEN	LIS	ARG	ORN	MOV	SOR	LAC	SAC	MAN	ADO	ARA	MAL	MLN
<i>Proteus</i>																			
<i>P. mirabilis</i>	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	0	2	15	0	0	0	0	2
<i>P. vulgaris</i>	98	95	0	15	95	95	99	0	0	0	95	0	2	97	0	0	0	97	0
<i>P. penneri</i>	0	100	0	0	30	100	99	0	0	0	85	0	1	100	0	0	0	100	0
<i>Providencia</i>																			
<i>P. rettgeri</i>	99	93	0	95	0	98	98	0	0	0	94	1	5	15	100	100	0	2	0
<i>P. stuartii</i>	98	100	0	93	0	30	95	0	0	0	85	1	2	50	10	5	1	1	0
<i>P. alcalifaciens</i>	99	99	0	98	0	0	98	0	0	1	96	1	0	15	2	98	1	1	0
<i>Salmonella</i>																			
<i>S. enterica</i> <sup>6</sup>	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	95	1	1	100	0	99	97	0
<i>S. typhi</i>	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	99	1	0	100	0	0	97	0
<i>S. choleraesuis</i>	0	100	0	25	50	0	0	95	55	100	95	90	0	0	98	0	100	95	0
<i>S. paratyphi A</i>	0	100	0	0	10	0	0	0	15	95	95	95	0	0	100	0	100	95	0
<i>Serratia</i>																			
<i>S. marcescens</i>	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	99	2	99	99	40	0	96	3
<i>S. liquefaciens</i>	1	93	93	90	0	3	0	95	0	95	95	95	10	98	100	5	98	98	2
<i>S. rubidae</i>	0	20	100	95	0	2	0	55	0	0	85	1	100	99	100	99	1	99	94
<i>Yersinia</i>																			
<i>Y. enterocolitica</i>	50	97	2	0	0	75	0	0	0	95	2	99	5	95	98	0	98	75	0
<i>Y. pestis</i>	0	80	0	0	0	5	0	0	0	0	0	50	0	0	97	0	100	80	0

Los valores indican el porcentaje de positividad de cepas para las diferentes pruebas o reacciones.

<sup>2</sup> IND, indol; RM, rojo de metilo; VP, Voges-Proskauers; CIT, citrato; URE, urea; FEN, fenilalanina desaminasa; LIS, lisina descarboxilasa; ARG, arginina dihidrolasa; ORN, ornitina descarboxilasa; MOV, movilidad; SOR, D-sorbitol; LAC, lactosa; SAC, sacarosa; MAN, D-manitol; ADO, D- adonitol; ARA, L-arabinosa; MAL, maltosa; MLN, malonato.

<sup>3</sup> *Citrobacter koserii* se le denominaba previamente *C. diversus*.

<sup>4</sup> *Enterobacter agglomerans* se le denomina ahora *Pantoea agglomerans*.

<sup>5</sup> *Shigella dysenteriae* (A), *Shigella flexneri* (B), *Shigella boydii* (C)

<sup>6</sup> *Salmonella enterica* se considera como una única especie con muchos serotipos y biotipos

**Cuadro 2.** Diferenciación del género *Citrobacter* (TSI A/A o K/A, móvil).

Especie	H <sub>2</sub> S	Ornitina descarboxilasa	Fermentación de D-Adonitol
<i>C. freundii</i>	78	0	0
<i>C. koserii</i>	0	99	99
<i>C. amalonaticus</i>	5	95	0

**Cuadro 3.** Diferenciación del género *Enterobacter* (TSI A/A, móvil).

Especie	Lisina descarboxilasa	Arginina dihidrolasa	Fermentación de D-Sorbitol	Fermentación de Lactosa
<i>E. aerogenes</i>	98	0	100	95
<i>E. cloacae</i>	0	97	95	93
<i>E. gergoviae</i>	90	0	0	55
<i>E. taylorae</i>	0	94	1	10
<i>E. sakazakii</i>	0	99	0	99

**Cuadro 4.** Diferenciación del género *Escherichia*.

Especie	TSI	Lisina descarboxilasa	Movilidad a 35°C	Fermentación de Lactosa	Fermentación de D-Sorbitol
<i>E. coli</i>	A/A	90	95	95	94
<i>E. coli</i> (inactiva)	K/A	40	5	25	75
<i>E. hermannii</i>	A/A	6	99	45	0

**Cuadro 5.** Diferenciación del género *Klebsiella* (TSI K/A o A/A, no móvil).

Especie	Indol	Rojo de metilo	Voges- Proskauer	Urea	Utilización de malonato
<i>K. pneumoniae</i>	0	10	98	95	93
<i>K. oxytoca</i>	99	20	95	90	98
<i>K. ozaenae</i>	0	98	0	0	3
<i>K. rhinoscleromatis</i>	0	100	0	0	95

**Cuadro 6.** Diferenciación del género *Proteus* (TSI A/A o K/A, H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>, móvil).

Especie	Indol	Ornitina descarboxilasa	Fermentación de Maltosa
<i>P. mirabilis</i>	2	99	0
<i>P. vulgaris</i>	98	0	97
<i>P. penneri</i>	0	0	100

**Cuadro 7.** Diferenciación del género *Providencia* (TSI A/A o K/A, móvil).

Especie	Fermentación de D-Manitol	Fermentación de D-Adonitol
<i>P. rettgeri</i>	100	100
<i>P. stuartii</i>	10	5
<i>P. alcalifaciens</i>	2	98

**Cuadro 8.** Diferenciación del género *Serratia* (TSI A/A, móvil).

Especie	Rojo de Metilo	Fermentación de L-Arabinosa	Fermentación de Lactosa	Utilización del Malonato
<i>S. marcescens</i>	20	0	2	3
<i>S. licuefaciens</i>	93	98	10	2
<i>S. rubidae</i>	20	1	100	94

**Cuadro 9.** Diferenciación del género *Yersinia* (TSI A/A o K/A, no móvil).

Especie	TSI	Urea	Ornitina descarboxilasa	Fermentación de Sacarosa
<i>Y. enterocolitica</i>	A/A	75	95	95
<i>Y. pestis</i>	K/A	5	0	0

**Cuadro 10.** Diferenciación del género *Shigella* (TSI K/A, no móvil)\*.

Especie	Ornitina descarboxilasa	Fermentación de Lactosa
<i>Shigella</i> spp. grupos A, B, C	1	30
<i>Shigella sonnei</i>	98	90

\* Se recomienda la identificación de las especies de *Shigella* por métodos serológicos.

**Cuadro 11.** Diferenciación de 3 biotipos de *Salmonella enterica* (TSI K/A, móvil)\*.

Especie	H <sub>2</sub> S	Lisina descarboxilasa	Ornitina descarboxilasa	Fermentación de L-Arabinosa
<i>S. typhi</i>	95	98	0	0
<i>S. choleraesuis</i>	50	95	100	100
<i>S. paratyphi A</i>	10	0	95	100

\* Se recomienda la clasificación de *Salmonella* por métodos serológicos.

## 5. Cronograma de actividades.

### DIA 1.

- Entrega de cultivos.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Sembrar cada bacteria en placas de:



1. Agar Sangre
2. Agar *Salmonella-Shigella*
3. Agar MacConkey
4. Agar Tergitol 7
5. Agar EMB de Levine
6. Agar Hektoen
7. Agar Bismuto Sulfito

- Incubar las placas de agar sangre en jarras con candela a 35°C por 24 horas.
- Incubar el resto de las placas a 35°C por 24 horas.

### **DIA 2.**

- Describir la morfología colonial de cada bacteria en los medios sembrados.
- Realizar un frotis de colonias para hacer la tinción de Gram.
- Inocular cada bacteria a partir del Agar MacConkey a Agar TSI utilizando el asa en punta. Incubar a 35°C por 24 horas.
- Subcultivar cada bacteria en Agar Sangre e incubar a temperatura ambiente por 24 horas para hacer tinción de flagelos.
- Subcultivar cada una de las bacterias en Agar Trypticasa-Soya inclinado. Incubar a 35°C por 24 horas.
- Realizar la prueba de oxidasa a partir del Agar Sangre. Utilizar un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo.
- Inocular los siguientes medios de cultivo para la realización de pruebas bioquímicas de identificación para cada una de las bacterias a partir del Agar Sangre.
  - Agar Movilidad
  - Gelatina Nutritiva
  - Caldo MRVP (dos tubos, uno para la prueba de Rojo de Metilo, otro para la prueba de Voges-Proskauer)
  - Agar Citrato de Simmons
  - Caldo Triptona (prueba de producción de indol)
  - Agar Urea de Christensen
- Inocular la tira de API20E de acuerdo a las instrucciones del mismo.

### **DIA 3.**

- Realizar la lectura del TSI.
- Realizar la prueba de ONPG a partir del TSI para cada una de las bacterias.
- Realizar la prueba de catalasa a partir del Agar Trypticasa-Soya inclinado. Utilizar un cultivo de *Enterococcus* como control negativo.
- Realizar la tinción de flagelos utilizando el colorante de Kodaka a partir del Agar Sangre incubado a temperatura ambiente.
- Realizar la lectura del API20E de acuerdo a las instrucciones.
- Realizar la lectura de los medios inoculados el día 2, utilizando los reactivos correspondientes:

Prueba	Medio de cultivo	Reactivos
Movilidad	Agar Movilidad	
Gelatinasa	Gelatina Nutritiva	
Rojo de Metilo		Rojo de Metilo
Voges-Proskauer		$\alpha$ -naftol y KOH-creatina
Fenilalanina desaminada	Agar Fenilalanina	Cloruro Férrico
Utilización de citrato	Agar Citrato de Simmons	
Producción de indol	Caldo Triptona	Xilol y Ehrlich
Producción de ureasa	Agar Urea de Christensen	
Descarboxilasas de lisina y ornitina	Caldo Base de Moeller con 1% de lisina y 1% de ornitina	
Deshidrolasa de arginina	Caldo Base de Moeller con 1% de arginina	
Reducción de nitratos	Caldo Nitratos	$\alpha$ -naftilamina, ácido sulfanílico y zinc en polvo
Fermentación de carbohidratos	Caldo Base Púrpura de Bromocresol conteniendo 1% de los carbohidratos.	

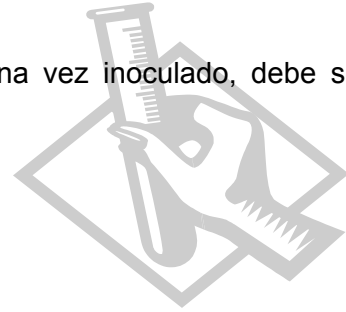
## 6. DISCUSION DE RESULTADOS.

1. ¿Cuál es la identificación de la bacteria que le fue entregada en esta práctica? ¿Cómo llegó usted a esa conclusión?

2. ¿Cuáles son las características en la morfología colonial de *Salmonella* y *Shigella* en los diferentes medios de cultivo que les diferencia de la mayoría de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae?

3. En la descripción de la morfología colonial, ¿cuáles reacciones observó alrededor de las colonias en los diferentes medios?

4. ¿Por qué el caldo Moeller con los diferentes aminoácidos, una vez inoculado, debe ser recubierto con una capa de Aceite mineral antes de ser incubado?





## IV VIBRIONACEAE



### 1. Generalidades de la familia Vibrionaceae.

La familia Vibrionaceae incluye los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*. Las diferentes especies de *Vibrio* y los otros géneros que se aíslan de muestras clínicas presentan características bioquímicas similares a las de los géneros de la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* y otros géneros relacionados.

Las especies de *Vibrio* se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos aerobios, con una estructura celular curva, tienen motilidad y poseen un flagelo polar, no forman esporas, miden de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.4 a 2.6  $\mu\text{m}$  de largo. Las especies de *Vibrio* crecen en presencia o ausencia de oxígeno. Todas estas especies producen la enzima citocromo C oxidasa (excepto la especie *Vibrio metschnikovi*), fermentan la glucosa y algunos producen gas. El cloruro de sodio estimula el crecimiento y algunas especies son estrictamente halofílicas. El género *Vibrio* contiene más de 30 especies y 12 de éstas son especies patógenas para el ser humano.

Los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* se conforman por bacilos Gram-negativos, móviles por flagelos polares y anaerobios facultativos. Sin embargo, con bases genéticas se ha propuesto que *Aeromonas* debería constituir su propia familia y que *Plesiomonas* está más relacionada a la familia Enterobacteriaceae. Pueden distinguirse de las bacterias entéricas en medios diferenciales que se usan para cultivarlas y por la reacción positiva a la prueba de oxidasa.

El patógeno más reconocido de la familia Vibrionaceae es *Vibrio cholerae* por la diarrea fatal que puede llegar a producir, otras especies del género *Vibrio*, como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus* se asocian tanto a infecciones intestinales como a extraintestinales. Las especies de *Aeromonas* son de vida libre y se encuentran en agua dulce y, en ocasiones, en reptiles, anfibios, peces y en el suelo o los alimentos, su importancia primaria en microbiología médica es en relación con la diarrea y a veces causan infecciones de heridas en agua dulce o infecciones en pacientes inmunocomprometidos y, raramente, otras infecciones intestinales. Las especies de *Plesiomonas* son más comunes en áreas tropicales y subtropicales; se han aislado de peces de agua dulce y numerosos animales. La mayor parte de *Plesiomonas* aisladas de humanos se ha obtenido de cultivo de heces de pacientes con diarrea.

Las especies de la familia Vibrionaceae son capaces de crecer en la mayoría de los medios rutinarios de laboratorio, incluyendo agar sangre y agar MacConkey. Las colonias producidas en estos medios son muy similares a las producidas por especies de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, debido a que algunas especies son específicamente halofílicas, es necesario agregar una concentración final de 1% NaCl a aquellos medios que

carecen de sal. Usualmente es necesario hacer un enriquecimiento de estas bacterias a partir de los diferentes tipos de muestras en Agua Peptonada Alcalina (APA) a 35°C por 6-12 horas en aerobiosis para aumentar la recuperación en los medios de aislamiento primario.

El medio de aislamiento primario más recomendado para la recuperación de las especies de *Vibrio* es el agar TCBS. Las placas de agar TCBS se incuban hasta por 48 horas antes de descartarlas. Es importante examinar cuidadosamente el crecimiento y el color de las colonias en las placas de agar TCBS.

**Cuadro 1** Apariencia en TCBS

Organismo	Color	Crecimiento
<i>V. alginolyticus</i>	Amarillo	Bueno
<i>V. carchariae</i>	Amarillo	Bueno
<i>V. cholerae</i>	Amarillo	Bueno
<i>V. cincinnatiensis</i>	Amarillo	Muy malo
<i>V. fluvialis</i>	Amarillo	Bueno
<i>V. furnissii</i>	Amarillo	Bueno
<i>V. metschnikovii</i>	Amarillo	Puede reducirse
<i>V. damsela</i>	Verde	Reducido a 35oC
<i>V. hollisae</i>	Verde	Muy malo
<i>V. mimicus</i>	Verde	Bueno
<i>V. parahaemolyticus</i>	Verde	Bueno
<i>V. vulnificus</i>	Verde	Bueno

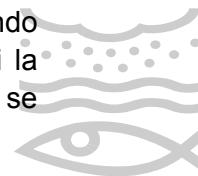
Es importante observar que en este medio, aunque es selectivo, pueden crecer algunas especies entéricas como *Proteus* y *Enterococcus*, pero sus colonias son usualmente pequeñas y translúcidas. Las colonias de las especies de *Proteus* que fermentan sacarosa producen colonias amarillas que deben ser diferenciadas de las de *Vibrio*. *Pseudomonas* y *Aeromonas* pueden crecer en placas de agar TCBS y usualmente forman colonias azules.

*Aeromonas* crece en medios diferenciales como el MacConkey y Levine, aunque puede ser aislado en placas de agar sangre (con 5% en sangre de cordero) conteniendo ampicilina a una concentración final de 10 µg/ml. *Plesiomonas* crece en medios diferenciales como el agar MacConkey y en medios moderadamente selectivos como el agar Hektoen. El medio de Hektoen es recomendado también para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*, por cuanto suprime el crecimiento de la mayoría de los miembros de la familia Enterobacteriaceae y detecta la producción de ácido de la fermentación de azúcar y H<sub>2</sub>S. Las colonias de *Plesiomonas* se ven azul o azul verdoso con centro o sin centro negro.

## 2. Pruebas bioquímicas para la identificación de géneros y especies de la familia Vibrionaceae

Para la identificación bioquímica de las especies de la familia Vibrionaceae se deben realizar las mismas pruebas descritas para Enterobacteriaceae. Sin embargo, una vez

realizado el aislamiento primario es esencial determinar si la bacteria es halofílica inoculando un caldo nutritivo conteniendo 0% y 3% de NaCl y se incuba a 35°C por 18-24 horas. Si la bacteria crece en presencia de 3% de NaCl pero no crece en el medio con 0% de NaCl, se puede concluir que la bacteria es halofílica.



En caso que se determine que la bacteria es halofílica, es necesario agregar NaCl a una concentración final de 1% a los siguientes medios antes de realizar las correspondientes pruebas bioquímicas:

Caldo MRVP  
Caldo Triptona  
Caldo Base de Moeller  
Caldo Malonato  
Caldo Nitratos con campana de Durham  
Caldo Base Púrpura Bromocresol  
Medio Gelatina

### 3. Cronograma de actividades

#### **DIA 1**

- Entrega de cultivos.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Sembrar cada bacteria en placas de:
  - Agar Sangre
  - Agar MacConkey
  - Agar TCBS
- Incubar las placas de Agar Sangre en jarras con candela por 18-24 horas a 35°C.
- Incubar el resto de las placas a 35°C por 18-24 horas.

#### **DIA 2**

- Describir la morfología colonial de cada bacteria en los medios sembrados considerando tamaño, forma, elevación, margen, tipo de superficie, características ópticas, producción de hemólisis y producción de pigmentos.
- Realizar un frotis y fijarlo para tinción de Gram.
- Inocular en Caldo Tripticasa-Soya al 0% y al 3% de NaCl. Incubar a 35°C por 24 horas.
- Inocular cada bacteria en Agar TSI. Incubar a 35°C por 24 horas.
- Realizar la prueba de oxidasa a partir del Agar Sangre.
- Realizar la prueba de catalasa a partir del Agar Sangre.
- Inocular los siguientes medios de cultivo a partir del Agar Sangre para la realización de pruebas bioquímicas de identificación para cada una de las bacterias:
  - Agar Movilidad
  - Caldo MRVP (dos tubos, uno para la prueba de Rojo de Metilo, otro para prueba de Voges-Proskauer)
  - Agar Citrato de Simmons

Caldo Triptona (prueba de producción de indol)

Agar Urea de Christensen

Caldo Base de Moeller con 1% de lisina, arginina y ornitina

Caldo Púrpura de Bromocresol con 1% de los siguientes azúcares: glucosa, sacarosa, arabinosa, manitol y salicina

- Inocular la bacteria en Agar Sangre e incubar a temperatura ambiente por 24 horas para hacer tinción de flagelos.

**DIA 3**

- Realizar la tinción de flagelos utilizando el colorante de Kodaka.
- Realizar la lectura de los medios inoculados el día 2 utilizando los reactivos correspondientes.
- Realizar la lectura del TSI.
- Realizar la prueba de ONPG a partir del TSI.



**Cuadro 2.** Características fenotípicas de especies de *Vibrio* clínicamente importantes.

Organismo	V. <i>cholerae</i>	V. <i>mimicus</i>	V. <i>metschnikovii</i>	V. <i>hollisae</i>	V. <i>damselfa</i>	V. <i>fluvialis</i>	V. <i>furnissii</i>	V. <i>alginolyticus</i>	V. <i>parahaemolyticus</i>	V. <i>vulnificus</i>
<b>Prueba</b>										
Producción de Indol*	99	98	20	97	0	13	11	85	98	97
Rojo Metilo*	99	99	96	0	100	96	100	75	80	80
Voges-Proskauer*	75	9	96	0	95	0	0	95	0	0
Citrato de Simmons	97	99	75	0	0	93	100	1	3	75
H <sub>2</sub> S en TSI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urea	0	1	0	0	0	0	0	0	15	1
Fenilalanina	0	0	0	0	0	0	0	1	1	35
Arginina*	0	0	60	0	95	93	100	0	0	0
Lisina*	99	100	35	0	50	0	0	99	100	99
Ornitina*	99	99	0	0	0	0	0	50	95	55
Movilidad (36°C)	99	98	74	0	25	70	89	99	99	99
Hidrólisis de gelatina*	90	65	65	0	6	85	86	90	95	75
Malonato	1	0	0	0	0	0	11	0	0	0
Ácido a partir de:										
D-Glucosa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Gas a partir de:										
D-Glucosa.	0	0	0	0	10	0	100	0	0	0
Ácido a partir de:										
D-Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Arabinosa	0	1	0	97	0	93	100	1	80	0
D-Arabitól	0	0	0	0	0	65	89	0	0	0
Celulosa	8	0	9	0	0	30	11	3	5	99
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactosa	90	82	45	100	90	96	100	20	92	96
Glicerol	30	13	100	0	0	7	55	80	50	1
Myo-Inositol	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa	7	21	50	0	0	3	0	0	1	85
Maltosa	99	99	100	0	100	100	100	100	99	100
D-Manitol	99	99	96	0	0	97	100	100	100	45

D-Manosa	78	99	100	100	100	100	100	99	100	98
Melibiosa	1	0	0	0	0	3	11	1	1	40
Rafinosa	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0
L- Ramnosa	0	0	0	0	0	0	45	0	1	0
Salicina	1	0	9	0	0	0	0	4	1	95
D-Sorbitol	1	0	45	0	0	3	0	1	1	0
Sacarosa	100	0	100	0	5	100	100	99	1	15
Trehalosa	99	94	100	0	86	100	100	100	99	100
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidrólisis de esculina	0	0	60	0	0	8	0	3	1	40
Utilización de Acetato	92	78	25	0	0	70	65	0	1	7
Nitrato → Nitrito	99	100	0	100	100	100	100	100	100	100
Oxidasa	100	100	0	100	95	100	100	100	100	100
Dnasa (25°C)	93	55	50	0	75	100	100	95	92	50
Lipasa	92	17	100	0	0	90	89	85	90	92
ONPG	94	90	50	0	0	40	35	0	5	75
Pigmento amarillo (25°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crecimiento en caldo nutritivo conteniendo:										
0% NaCl	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1% NaCl	100	100	100	99	100	99	99	99	100	99
6% NaCl	53	49	78	83	95	96	100	100	99	65
8% NaCl	1	0	44	0	0	71	78	94	80	0
10% NaCl	0	0	4	0	0	4	0	69	2	0
12% NaCl	0	0	0	0	0	0	0	17	1	0
Swarming (25°C)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Prueba vibrostática 0/129	99	95	90	40	90	31	0	19	20	98
Inhibición Polimixina B	22	88	100	100	85	100	89	63	54	3

<sup>1</sup> Los valores indican porcentaje de positividad de diferentes cepas para una misma prueba bioquímica

<sup>2</sup> Estas pruebas se realizaron en los correspondientes medios de cultivo conteniendo 1% de NaCl

<sup>3</sup> + indica ≥90% de positividad, - indica ≤10% de positividad

**Cuadro 3.** Clasificación de especies de los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* clínicamente importantes.

Organismo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> biovar	<i>A. veronii</i> biovar	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. trota</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<b>Prueba</b>								
Producción de Indol	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	< 10	> 90	> 90
Rojo de Metilo	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	ND	> 90	> 90
Voges-Proskauer	> 90	< 10	> 90	> 90	> 90	< 10	< 10	< 10
Citrato (Simmons)	20 - 80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 10
Urea	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
H <sub>2</sub> S en TSI	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Malonato	< 10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 10
Arginina	> 90	> 90	> 90	< 10	> 90	> 90	> 90	> 90
Lisina	> 90	< 10	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
Ornitina	< 10	< 10	< 10	> 90	< 10	< 10	< 10	> 90
Motilidad (36°C)	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 85
Gas a partir de:								
D-Glucosa.	> 90	< 10	> 90	> 90	> 90	< 10	> 90	> 90
Acido a partir de:								
D-Glucosa	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
Ramnosa	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
L-Arabinosa	> 90	> 90	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Maltosa	> 90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	> 90
Trehalosa	> 90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	> 90
Myo-Inositol	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	> 90
Lactosa	< 10	> 90	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
D-Manitol	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	< 10	> 90	< 10
D-Manosa	> 90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 10
Salicina	> 90	> 90	< 10	> 90	< 10	< 10	< 10	20 - 80
Sacarosa	> 90	> 90	> 90	> 90	< 10	< 10	< 10	< 10
Hidrólisis de esculina	> 90	> 90	< 10	> 90	< 10	< 10	< 10	< 10
Amilasa	> 90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 10
Nitrato → Nitrito	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
Oxidasa	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
Test ONPG	> 90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20 - 80
Prueba vibrostática 0/129	R	R	R	R	R	R	R	S
β-hemólisis sangre carnero	> 90	< 10	> 90	> 90	> 90	20 - 80	20 - 80	< 10

ND, no hay datos; R, resistente; S, sensible

#### 4. Discusión de resultados.

1. ¿Cómo se puede diferenciar, con las pruebas bioquímicas realizadas en el laboratorio, las especies de la familia Vibrionaceae de las de la familia Enterobacteriaceae?



2. ¿Cuáles fueron los medios de cultivo para aislamiento primario en los que crecieron adecuadamente las especies estudiadas?

3. ¿Por qué el agar TCBS es selectivo?

4. ¿Podría usted afirmar que todas las bacterias que crecen en el agar TCBS pertenecen a la familia Vibrionaceae?

5. ¿Cómo se puede diferenciar *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides* de las especies de *Vibrio* estudiadas?





## PSEUDOMONAS Y BURKHOLDERIA



### 1. Generalidades de *Pseudomonas* y *Burkholderia*

Las especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* son en general catalasa y oxidasa positivas. Morfológicamente indistinguibles al Gram, se presentan como bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos. Su tamaño oscila entre 1 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Son aerobios, aunque algunas cepas pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas usando el nitrato como aceptor final de electrones. No forman esporas y son móviles con 1 o más flagelos polares a excepción de *B mallei*, el cual no es móvil. Estos grupos tienen requerimientos nutricionales mínimos y crecen en agar MacConkey como no fermentadores de lactosa.

Las especies de éstos géneros pueden encontrarse ampliamente distribuidos en el ambiente; suelos, agua y formando parte de la flora normal de animales y del hombre. Debido a su habilidad de sobrevivir en ambientes húmedos y de poseer una resistencia innata a los antibióticos, este patógeno es particularmente importante en infecciones intrahospitalarias. Como son agentes patógenos oportunistas, pueden producir infecciones serias en pacientes con compromiso inmunológico; convirtiéndose así en agentes importantes de infecciones nosocomiales. La virulencia de éstos agentes radica en su capacidad de colonizar varios sitios anatómicos humanos, la propiedad para invadir tejidos y producir daño tisular. Además de la tendencia característica de invadir torrente sanguíneo.

*P aeruginosa* puede encontrarse produciendo infecciones en piel de pacientes quemados, en esputos de pacientes con fibrosis quística y una gran variedad de infecciones. *P fluorescens* puede producir bacteremia en pacientes transfundidos debido a su capacidad de crecer a 4°C, ambiente bajo el cual se almacena la sangre en los Bancos de Sangre. *P stutzeri* y *P versicularis* han sido reportados produciendo bacteremias en pacientes hemodializados, por encontrarse contaminado el equipo de diálisis renal. *P. alcaligenes* se ha reportado produciendo endocarditis asociado a infección por contaminación de un catéter en un paciente con trasplante de médula ósea.

*B pseudomallei* produce la melioidosis en animales, transmisible a humanos. *B cepacia* se asocia con bacteremias e infecciones del tracto urinario, particularmente cuando se hace uso de catéteres. *B mallei*, *B picketii* y *B gladioli* no son importantes en infecciones en humanos.

Los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* pertenecen, entre otras bacterias, a un grupo conocido como bacilos Gram negativos no fermentadores - no fastidiosos. Este grupo es muy heterogéneo, se encuentran géneros móviles y no móviles, inertes a los carbohidratos y otros que son capaces de utilizar carbohidratos vía oxidativa. Pero en general, se caracterizan por ser aerobios estrictos y tener requerimientos nutricionales mínimos. Las especies de *Pseudomonas* se clasifican según el grado de homología que haya en el ARNr de manera que se han descrito las especies: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. putida* y *P. versicularis*. Existe otro género conocido como *Burkholderia* donde se han agrupado otras especies que pertenecieron anteriormente al género de las *Pseudomonas*. Entre ellas están: *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. picketii*, *B. mallei* entre otras.

El grupo de bacilos gram negativos no fermentadores no fastidiosos incluyen los siguientes géneros:

Géneros de bacilos no fermentadores no fastidiosos
<i>Pseudomonas</i>
<i>Burkholderia</i>
<i>Acinetobacter</i>
<i>Moraxella</i>
<i>Eikenella</i>
<i>Flavobacterium</i>
<i>Alcaligenes (Achromobacte )</i>
<i>Actinobacillus</i>
<i>Capnocytophaga</i>
<i>Cardiobacterium</i>
<i>Chromobacterium</i>
<i>Kingella</i>
<i>Stenotrophomonas (Xanthomonas)</i>

## 2. Morfología colonial en medios de aislamiento primario

A continuación se describe la morfología colonial de algunas especies observada en medios selectivos y diferenciales.

- **Agar Sangre.** Este medio es utilizado para el aislamiento primario de la mayoría de las cepas cultivables en el laboratorio, que producen patologías en seres humanos. A las 18 horas de incubación se observan colonias medianas de 2 a 3 mm de diámetro y brillantes. La mayoría de las cepas no producen hemólisis, pero en algunas cepas es posible apreciarla debido a la producción de una esfingomielinasa que es capaz de lisar los eritrocitos del medio. Algunas veces se puede observar la producción de pigmentos como la pioverdina, que se aprecia como una coloración verdosa que difunde en el agar.
- **Agar MacConkey.** Igual al anterior separa las bacterias que utilizan fermentativamente la lactosa, de los que no la utilizan. Para ambos casos, tanto *Pseudomonas* como *Burkholderia* presentan colonias translúcidas lactosa negativa.

## 3. Pruebas bioquímicas de identificación

- **Agar OF.** Se usa para determinar el comportamiento metabólico de los bacilos gram negativos ante diferentes carbohidratos. Se puede observar si lo utiliza o no, y si lo hace oxidativamente o fermentativamente. Los tubos con medio OF se mantienen en agua hirviendo por 10 minutos para eliminar el oxígeno que se encuentre en el medio. Después se deja enfriar y se procede a inocular. Para el caso de la glucosa, se requiere de un tubo sellado con VASPAR y uno con atmósfera aerobia. Los demás carbohidratos NO se sellan con VASPAR.

- **Agar Almidón.** Determina la producción de enzimas que producen la hidrólisis del almidón. Si la bacteria es capaz de hidrolizar almidón, al agregarle yodo al medio, quedará un halo transparente alrededor de la colonia. Este halo evidencia así la presencia de almidón hidrolizado. Este medio se raya por estría.
- **Agar F.** Se utiliza para determinar la producción de pioverdina pues inhibe la producción de piocianina.
- **AgarP.** Se utiliza para determinar la producción de piocianina debido a que inhibe la producción de pioverdina.

#### 4. Cronograma de actividades

##### DIA 1

- Entrega de cultivos.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Sembrar cada bacteria en 2 placas de agar Sangre y 2 placas de agar MacConkey e incubar a 37°C y a TA.

##### DIA 2

- Describir la morfología colonial de cada bacteria en los medios sembrados considerando tamaño, forma, elevación, margen, tipo de superficie, características ópticas, producción de hemólisis y producción de pigmentos.
- Realizar un frotis y fijarlo para tinción de Gram.
- Realizar la prueba de oxidasa a partir del agar sangre.
- Inocular los siguientes medios de cultivo para la realización de pruebas bioquímicas de identificación para cada una de las bacterias:
  - Agar TSI
  - Agar Tripticasa Soya Inclinado
  - Caldo Tripticasa Soya (movilidad, incubar 6 horas)
  - Agar P
  - Agar F
  - Agar Tripticasa Soya conteniendo 6.5%NaCl
- Inocular dos tubos con Caldo Tripticasa Soya, Incubar uno a 37°C y otro a 42°C.
- Incubar una placa de agar Sangre a temperatura ambiente por un período de 18-24 horas para realizar tinción de flagelos.

##### DIA 3

- Realizar la tinción de flagelos utilizando el colorante de Kodaka.
- Realizar la lectura prueba de la catalasa a partir del agar Tripticasa Soya inclinado.
- Realizar lectura del TSI
- Realizar la lectura de crecimiento a 35°C y a 42°C.
- Para la lectura del agar F observar la placa bajo una luz ultravioleta (luz de Wood). La presencia de fluorescencia indica una prueba positiva.
- Para la lectura del agar P para determinar la presencia de piocianina, picar el agar con un mondadientes y luego agregar 3 ml de cloroformo que posteriormente se depositan en un tubo. Observar la presencia o ausencia de una coloración azul tras un fondo blanco. La presencia de una coloración azul indica una prueba positiva.



## 5. Discusión de resultados.

1. Explique cuáles son las diferencias para la realización, lectura y la interpretación de la prueba de descarboxilación de aminoácidos para las bacterias fermentadoras y para las bacterias no fermentadoras

2. ¿Cuáles son las características morfológicas y bioquímicas que permiten diferenciar *P. aeruginosa* de las otras especies de *Pseudomonas* y de *Burkholderia*?

3. Si un bacilo Gram-negativo no fermentador utiliza la lactosa en el medio OF y crece en agar MacConkey, por que no se observa evidencia de la utilización de lactosa en el agar MacConkey?

6. Clasificación de las especies clínicamente importantes de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia***Cuadro 1.** Características fenotípicas de especies del género *Pseudomonas*

Organismo	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. pseudo-alcaligenes</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. diminuta</i>	<i>P. versicularis</i>
Prueba								
Oxidasa	100	100	100	100	100	100	100	100
Crecim. en MacConkey	99	100	100	100	93	98	96	26
Crecim. en 42 °C	100	0	0	90	75	48	19	0
Reducción de nitratos	74	19	0	100	93	61	4	7
Gas en nitratos	60	4	0	100	5	0	0	0
Pioverdina	69	91	82	0	0	0	0	0
Hidrólisis de arginina	99	99	99	0	36	7	0	0
Descarbox. de lisina	0	0	0	0	0	ND	0	0
Desamin de fenilalanina	8	3	2	55	21	20	16	6
Indol	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidrólisis de urea	66	44	43	17	8	21	0	0
Hidrólisis de gelatina	46	100	0	0	3	2	58	38
Hidrólisis de esculina	0	0	0	0	0	ND	0	100
Acido a partir de: Glucosa	98	100	100	100	19	0	29	57
Fructosa	89	99	99	95	100	0	0	0
Galactosa	81	98	99	91	4	0	0	15
Manosa	79	99	99	89	1	0	0	0
Rhamnosa	22	43	28	23	0	0	0	38
Xylosa	85	97	98	94	8	0	0	11
Lactosa	0	11	13	0	0	0	0	0
Sacarosa	0	47	10	0	0	0	0	0
Maltosa	12	31	19	99	11	0	0	62
Manitol	68	93	17	70	3	0	0	0
Lactosa	14	61	42	0	0	0	0	0
Movilidad	95	100	100	100	90	98	100	98
No. de flagelos	1	>1	>1	1	1	1	1	1

Los valores indican el porcentaje de positividad de cepas para las diferentes pruebas o reacciones. ND, no determinado.

**Cuadro 2.** Características fenotípicas de especies del género *Burkholderia*

Organismo	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>	biovar 1	<i>B. pickettii</i> biovar 2	biovar 3
Prueba	100	25	93	0	100	100	100
Oxidasa	100	88	95	100	77	100	100
Crecim. en Mac Conkey	100	6	60	0	26	60	60
Crecim. a 42 °C	100	100	37	33	87	100	20
Reducción de nitratos	100	0	0	0	84	100	10
Gas de nitratos	100	100	0	0	0	0	0
Hidrólisis de arginina	0	0	92	0	0	0	0
Descarboxi. de ornitina	0	0	66	0	0	0	0
Desamina. de fenilalanina	0	ND	2	0	3	40	0
Hidrólisis de urea	43	12	45	100	100	100	100
Hidrólisis de gelatina	100	0	74	100	77	40	80
Hidrólisis de esculina	57	0	67	0	0	0	0
Acido de:							
Glucosa	100	100	100	100	100	100	100
Fructosa	100	ND	100	100	100	100	100
Galactosa	100	ND	100	100	100	100	100
Manosa	100	ND	100	100	100	100	100
Ramnosa	71	ND	0	0	0	0	0
Xilosa	86	12	99	100	100	100	100
Lactosa	100	12	99	0	100	0	100
Sacarosa	86	0	83	0	0	0	0
Maltosa	100	0	98	0	100	0	100
Manitol	100	62	100	100	0	0	100
Lactosa	100	ND	0	98	81	0	100
Movilidad	100	0	99	100	94	96	100
No. de flagelos	>1	0	>1	1	1	1	1

Los valores indican el porcentaje de cepas para las diferentes pruebas o reacciones. ND, no determinado

## VI OTROS BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES



### 1. Generalidades

Al grupo de bacilos gram negativos no fermentadores pertenecen bacterias taxonómicamente muy diversas, pero esta agrupación es útil para la clasificación en el diagnóstico clínico. Muchas de estas especies son incapaces de acidificar medios como el TSI y crecen considerablemente mejor en condiciones aerobias que en condiciones anaeróbicas. Incluso se encuentran algunas cepas que son incapaces de crecer anaeróbicamente. Este grupo de bacterias se consideran como patógenos oportunistas, especialmente de infecciones intrahospitalarias, donde los principales factores de riesgo para los pacientes son tratamientos con antimicrobianos y/o cirugía, instrumentación y permanencia del paciente en salas de cuidados intensivos por períodos prolongados. Adicionalmente, es importante considerar la resistencia natural a los antibióticos que muchas de estas bacterias presentan y la facilidad con la que adquieren resistencia a otros antibióticos.

A las pruebas de escrutinio que se utilizan para su identificación como morfología microscópica, oxidasa, movilidad, producción de indol y acidificación de carbohidratos, se le han agregado pruebas como el crecimiento a temperatura ambiente y crecimiento en medios selectivos como el agar MacConkey. Algunas cepas solamente crecen a temperatura ambiente y son incapaces de crecer en agar MacConkey. En este grupo se encuentran géneros como *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Eikenella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* (*Achromobacter*), *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Stenotrophomonas* y *Kingella*, entre otras de menor importancia médica.

*Pseudomonas aeruginosa* es la especie más frecuentemente aislada del grupo de bacilos Gram-negativos no fermentadores, seguida de *Acinetobacter* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia*. Estos dos últimos agentes se caracterizan por producir infecciones intrahospitalarias y en su gran mayoría se asocian al uso de respiradores o al implante de catéteres. Como una característica importante, estos dos agentes presentan una elevada resistencia natural a los antibióticos y son capaces de adquirir resistencia contra otros antibióticos con facilidad. Por lo anterior, estos agentes son importantes en el ambiente hospitalario y son cada vez más frecuentes los aislamientos de estas bacterias produciendo infecciones severas.

La especie *Stenotrophomonas maltophilia* ha sufrido una serie de cambios taxonómicos. Inicialmente, fue clasificada como *Pseudomonas maltophilia*, luego se reclasificó en el género *Xanthomonas* y hasta años recientes que se le asignó a un nuevo género denominado *Stenotrophomonas*. Esta bacteria es un bacilo no fermentador, que produce colonias en agar sangre de tono amarillento, crema claro o verde lavanda, opacas y con un fuerte olor amoniacal. Si se crece en agar nutritivo, sus colonias presentan una coloración amarillenta, con un pigmento soluble en agua pero que no difunde al agar. Esta especie es móvil, utiliza la maltosa, es oxidasa negativo y ONPG positiva. *S. maltophilia* se asocia como agente de neumonías primarias e infecciones nosocomiales como septicemias, infecciones urinarias, bronconeumonías por aspiración, infecciones de heridas, mastoiditis y ectima gangrenoso. Es importante en infecciones de pacientes con cáncer.

Las especies de *Acinetobacter* se caracterizan por ser bacilos pequeños o bien cocobacilos, son no móviles, oxidasa negativa y pueden tener una morfología en pares (diplococo). Sus colonias en agar sangre no son características (producen colonias planas, opacas y pequeñas), crecen bien en agar MacConkey, pero con colonias de pequeño tamaño, incoloras o bien escasamente pigmentadas de rosado.

En infecciones vaginales, es importante descartar la presencia de *Acinetobacter* spp. ya que puede presentar una morfología semejante *Neisseria gonorrhoeae*. La diferenciación se puede hacer mediante la prueba de crecimiento en agar MacConkey y la prueba de citocromo C oxidasa. A diferencia de *Acinetobacter* spp, *Neisseria gonorrhoeae* no crece en MacConkey y es oxidasa positivo. Las especies de *Acinetobacter* están ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en ambientes húmedos como en superficies secas y pueden ser parte de la flora normal de la piel y mucosas de los seres humanos. Las especies más frecuentes aisladas son *A.baumannii*, *A. iwoffii*, *A. haemolyticus*, y *A. johnsonii*.

Otros bacilos gram negativos no fermentadores tienen bajos porcentajes de aislamiento en muestras clínicas, por lo que su importancia es mucho menor. Sin embargo tienen características epidemiológicas y reacciones bioquímicas semejantes a los dos agentes indicados anteriormente. Todos los bacilos Gram negativos no fermentadores presentan una amplia resistencia a los antimicrobianos, son organismos que causan infecciones intrahospitalarias y tienen su origen en ambientes acuáticos.

Las especies de *Moraxella* son cocobacilos oxidasa positiva, no móviles y se presentan como asacarolítico porque es inerte a los carbohidratos. Estas especies pueden encontrarse como flora normal de piel y mucosas. Se ha demostrado que por lo menos *Moraxella osloensis*, *M. liquefaciens* y *M. lincolnii* son flora normal de vías respiratorias humanas, aunque rara vez se encuentran produciendo bacteremia, endocarditis, conjuntivitis y meningitis. *Moraxella catarrhalis* es frecuente en infecciones óticas en niños. *Oligella* spp. son un grupo de cocobacilos, siendo las especies más importantes de este grupo *Oligella urethralis* y *Oligella ureolytica*, que se han encontrado produciendo infecciones urinarias. *Eikenella* spp. son también flora normal gingival e intestinal. La especie más importante es *Eikenella corrodens*, un bacilo Gram negativo oxidada positivo, se ha encontrado produciendo infecciones locales por mordeduras humanas.

La especie *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* es una bacteria no móvil, oxidasa positiva que produce un pigmento amarillo. Es un agente causante de meningitis y sepsis neonatal, aunque es muy raro encontrar esta especie en infecciones de adultos. Esta especie coloniza vías respiratorias, por lo que es frecuente encontrarlo en aislamientos de muestras clínicas humanas. Las especies de *Alcaligenes* son bacilos móviles por flagelos peritricos que están bioquímica y filogenéticamente muy relacionados con *Bordetella*. Al cultivarlas, las colonias presentan olor a frutas y produce un color verdoso en el agar sangre. Se encuentran frecuentemente contaminando nebulizadores y respiradores. Las especies más importantes en muestras clínicas son *A. faecalis*, *A. piechaudii*, *A. xylosoxidans* subsp. denitrificans y *A. xylosoxidans* subsp. xylosoxidans.

Otros grupos menos frecuentes incluyen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, un cocobacilo involucrado en enfermedad periodontal y *Capnocytophaga*, bacilos fusiformes filamentosos de la flora normal de boca, aunque *C. gingivalis* produce enfermedad periodontal



en humanos y *C. canimorsis* es flora normal de perros por lo que se encuentra produciendo infecciones en heridas por mordeduras de perros.

Adicionalmente se incluyen en este heterogéneo grupo de bacterias a *Cardiobacterium hominis*, un bacilo pleomórfico causante de endocarditis que crecen lentamente en agar sangre, por lo que se debe incubar el medio por dos o tres semanas.

*Chromobacterium violaceum* es una bacteria muy similar a *Pseudomonas* pero se diferencia por producir un pigmento violeta. Esta especie produce abscesos y diarrea y las infecciones con esta bacteria, aunque infrecuentes, tienen una alta tasa de mortalidad.

## **2. Clasificación de los diferentes géneros y especies de bacilos Gram negativos, no fermentadores, distintos a *Pseudomonas* y *Burkholderia***

A continuación se brindan una serie de cuadros que pueden ser utilizados como una guía para la identificación de bacilos Gram negativos, no fermentadores, diferentes a *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Nótese que se utilizan las mismas pruebas bioquímicas para la identificación de este grupo-. El cuadro 1 puede ser utilizado para la orientación inicial en la identificación. Mientras que los cuadros 2-7 se utilizan en la identificación final a nivel de especie.

**Cuadro 1.** Esquema para la identificación de bacilos Gram-negativos no fermentadores diferentes a *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

NO OXIDADORES DE GLUCOSA	OXIDADORES DE GLUCOSA
<p><b>MacConkey positivo</b> <b>Oxidasa negativo</b> NO MOVILES      <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> subsp. <i>iwoffi</i></p> <p>Oxidasa positivo MOVILES      <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Alcaligenes odorans</i></p> <p>NO MOVILES      <i>Alcaligenes denitrificans</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Achromobacter xylooxidans</i> <i>Flavobacterium odoratum</i> <i>Moraxella nonliquefaciens</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Moraxella phnylpiruvica</i></p> <p>                         <i>Moraxella urethralis</i></p> <p>                         <i>Moraxella atlantae</i></p>	<p><b>MacConkey positivo</b> <b>Oxidasa negativo</b> NO MOVILES      <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratu</i>s</p> <p>Oxidasa positivo MOVILES      <i>Achromobacter spp.</i> <i>Achromobacter xylooxidans</i> <i>Agrobacterium spp.</i></p> <p>NO MOVILES      <i>Flavobacterium meningosepticum</i> <i>Flavobacterium breve</i> <i>Flavobacterium multivorum</i> <i>Flavobacterium spiritrivorum</i></p>
<p><b>MacConkey negativo</b> <b>Oxidasa positivo</b> NO MOVILES      <i>Eikenella corrodens</i> <i>Flavobacterium spp.</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Moraxella nonliquefaciens</i> <i>Moraxella bovis</i> <i>Moraxella osloensis</i></p>	<p><b>MacConkey negativo</b> <b>Oxidasa positivo</b> NO MOVILES      <i>Flavobacterium spp.</i> <i>F. spiritrivorum</i></p>

**Cuadro 2.** Bacilos Gram-negativos, no fermentadores, oxidasa negativa, indol negativo<sup>1</sup>.

Prueba	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Movilidad	–	+	+
Pigmento	–	amarillo	café
Crecim. en MacConkey	V	+	+
Crecim. a 42 °C	V	V	V
Reducción de nitratos	–	–	V
Hidrólisis de esculina	–	–	+
Hidrólisis de gelatina	V	–	+
Ureasa	V	V	–
Arginina	–	–	–
ONPG	–	–	+
Acido a partir de:			
Glucosa	V	+	+
Maltosa	V	+	+
Sacarosa	–	V	V
Manitol	–	+	–
Xilosa	V	+	V

<sup>1</sup> +, porcentaje de positividad >90%; –, porcentaje positividad <10%; V, porcentaje de positividad 10-90%.

**Cuadro 3.** Características fenotípicas de especies de *Acinetobacter*<sup>1</sup>.

Prueba	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. lwoffii</i>
Crecim a 37 °C	100	100	100	0	100
Crecim a 41 °C	0	100	0	0	0
Hidrólisis de gelatina	0	0	96	0	0
Acido de glucosa	100	95	52	0	0
Arginina	100	98	96	35	0
Citrato	100	100	91	100	0
Malonato	100	98	0	13	0

<sup>1</sup> Los valores indican porcentaje de positividad.

**Cuadro 4.** Cocobacilos Gram-negativos, asacarolíticos, oxidasa-positivos, indol negativos<sup>1</sup>.

Prueba	<i>Moraxella lacunata</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	<i>Oligella urethralis</i>	<i>Oligella ureolytica</i>
Movilidad	-	-	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Crec. MacConkey	-	V	V	V	V
Crec. a 42 °C	-	ND	V	+	-
Ureasa	-	-	+	-	+
Fenilalanina desam.	ND	-	+	+	+
Hidról. de gelatina	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	V	V	-	+

<sup>1</sup> Ver Cuadro 2.**Cuadro 5.** Bacilos Gram-negativos, no cocoides, asacarolíticos, oxidasa positivos, indol negativos<sup>1</sup>.

Prueba	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp <i>denitrificans</i>	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>
Crec. MacConkey	+	+	+	+	+
Reducción de Nitratos	-	+	+	-	+
Ureasa	-	-	-	+	-
Flagelos	pe <sup>2</sup>	pe	pe	-	> 1 po
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	V	-

<sup>1</sup> Ver Cuadro 2<sup>2</sup> pe, peritricos; po, polares

**Cuadro 6.** Bacilos Gram-negativos, no cocoides, sacarolíticos, no fermentadores, oxidasa positivos, indol negativos<sup>1</sup>.

Prueba	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp <i>xylosoxidans</i>	<i>Ochrobactrum antropi</i>	<i>Flavobacterium spiritivorum</i>
Crecim. en MacConkey	+	+	+	+
Pigmento	-	-	-	amarillo claro/ -
ONPG	+	-	-	+
Arginina dihidrolasa	-	V	V	-
Flagelos	pe	pe	pe	-
Reducción de nitratos	+	+	+	-
Ureasa	+	-	+	+
Hidrólisis de esculina	+	-	V	+
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-
Acido a partir de:				
Glucosa	+	+	+	+
Maltosa	+	-	V	+
Sacarosa	+	-	V	+
Manitol	+	-	V	+
Xilosa	+	+	+	+

<sup>1</sup> Ver Cuadro 2.**Cuadro 7.** Bacilos Gram-negativos, no fermentadores, oxidasa positiva, indol positivo, no móviles<sup>1</sup>.

Prueba	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Flavobacteriumb reve</i>	<i>Weeksella virosa</i>	<i>Weeksella zoohelcum</i>
Catalasa	+	+	+	+
Crecim. en MacConkey	V	ND	-	-
Crecim a 42 °C	V	-	V	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-
ONPG	+	-	-	-
Hidrol. de almidón	-	V	-	-
Ureasa	-	-	-	+
Hidrólisis esculina	+	-	-	-
Hidrólisis gelatina	+	+	+	+
Acido a partir de:				
Glucosa	+	V	-	-
Maltosa	+	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

<sup>1</sup> Ver Cuadro 2.



### 3. Cronograma de actividades.

#### **DIA 1.**

- Entrega de cultivos.
- Realizar frotis y tinción de Gram
- Describir la morfología microscópica
- Sembrar cada bacteria en 2 placas de agar Sangre y 2 placas de agar MacConkey e incubar a 37°C y a TA.

#### **DÍA 2.**

- Describir la morfología colonial de cada bacteria en los medios sembrados considerando el tamaño, la forma, la elevación, el margen, el tipo de superficie, las características ópticas y la producción de pigmentos de la colonia.
- Realizar un frotis y fijarlo para hacer la tinción de Gram.
- Realizar la prueba de oxidasa a partir del agar sangre.
- Inocular los siguientes medios de cultivo para la realización de pruebas bioquímicas de identificación para cada una de las bacterias:
  - Agar TSI
  - Agar Tripticasa Soya Inclinado
  - Caldo Tripticasa Soya (movilidad, incubar 6 horas)
  - Agar P
  - Agar F
  - Agar Tripticasa Soya conteniendo 6,5% NaCl
- Inocular dos tubos con Caldo Tripticasa Soya. Incubar un tubo a 37°C y otro a 42°C.
- Incubar una placa de agar Sangre a temperatura ambiente por un período de 18-24 horas para realizar tinción de flagelos.

#### **DIA 3**

- Realizar la lectura del TSI.
- Realizar tinción de flagelos de Kodaka.
- Realizar la prueba de la catalasa a partir del agar Tripticasa Soya inclinado.
- Realizar la lectura de crecimiento a 35°C y a 42°C.
- Para la lectura del agar F observar la placa bajo una luz ultravioleta (luz de Wood). La presencia de fluorescencia indica una prueba positiva.
- Para la lectura del agar P para determinar la presencia de pirocianina. picar el agar con un mondadientes y luego agregar 3 ml de cloroformo que posteriormente se depositan en un tubo. Observar la presencia o ausencia de una coloración azul tras un fondo blanco. La presencia de una coloración azul indica una prueba positiva.
- Realizar la lectura del resto de las pruebas bioquímicas.

### 4. Discusión de resultados.

1. ¿Cuáles son las principales diferencias fenotípicas entre las especies de *Pseudomonas*, *Burkholderia* estudiadas en la práctica anterior y los otros géneros de bacilos Gram negativos no fermentadores estudiados en esta práctica?
2. ¿Por qué algunos de los bacilos Gram-negativos no fermentadores, a pesar de tener estructura de Gram-negativo, no crecen en agar MacConkey?
3. ¿Por qué algunos de los bacilos Gram-negativos no fermentadores, a pesar de tener metabolismo aeróbico, no producen la enzima citocromo C oxidasa?
4. Explique la importancia clínica del aislamiento e identificación de este grupo de bacilos Gram-negativos no fermentadores en un laboratorio de bacteriología clínica.

## VII BACTERIAS GRAM NEGATIVAS FASTIDIOSAS



### 1. Generalidades del género *Haemophilus*

El género *Haemophilus* se compone de cocobacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Su crecimiento es generalmente óptimo cuando se incuba a 33-37°C en una atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub>. A la mayoría de las especies se les considera nutricionalmente fastidiosas porque requieren para su crecimiento medios enriquecidos con NAD (factor V) y/o hemina (factor X), por lo que usualmente no crecen en agar sangre, el cual contiene adecuadas cantidades de hemina pero contiene factor V únicamente dentro de los eritrocitos. Sin embargo, *Haemophilus* puede crecer en agar sangre alrededor de otras bacterias, como *Staphylococcus aureus*, que proporcionen el factor V. A este fenómeno se le conoce como satelitismo. Las especies de *Haemophilus* pueden presentar además pleomorfismo celular, dependiendo de la edad del cultivo y el medio que se utiliza. En los cultivos más viejos se observan células bacterianas con formas bacilares, mientras que en los cultivos más jóvenes se encuentran formas cocoides o cocobacilares.

En el género *Haemophilus* se han descrito nueve especies que se asocian al ser humano, ya sea como flora normal en el tracto respiratorio superior o como agentes de infecciones:

*H. influenzae*  
*H. parainfluenzae*  
*H. haemolyticus*  
*H. parahaemolyticus*  
*H. aphrophilus*  
*H. paraaphrophilus*  
*H. segnis*  
*H. aegyptus*  
*H. ducreyi*

Las especies que pueden estar asociadas a infecciones en el ser humano incluyen *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*. Sin embargo la especie más importante desde el punto de vista de las infecciones en el ser humano es *H. influenzae*. *H. influenzae* puede formar parte del tracto respiratorio superior hasta en un 50% de la población normal. La presencia de una cápsula de polisacáridos extracelulares se considera como uno de los principales factores de virulencia en esta especie, aunque no todas las cepas son encapsuladas. Se han descrito seis tipos capsulares antigénicamente diferentes, denominados de **a** a **f**, presentes en cepas tipificables, mientras que a las cepas no encapsuladas se les denomina frecuentemente no tipificables o NT. Las cepas de *H. influenzae* tipo b se encuentran colonizando hasta un 5% de los niños, aunque son raras en individuos adultos, y son las que causan más frecuentemente infecciones invasivas graves en niños menores de cinco años de edad. *H. influenzae* de tipo b es responsable de cuadros de meningitis con precedente de infecciones respiratorias y otitis, epiglotitis, celulitis periorbitaria, artritis séptica, neumonía y conjuntivitis. Las cepas de *H. influenzae* de los otros serotipos, así como las cepas no tipificables, pueden causar infecciones como neumonías y bronquitis en adolescentes y adultos, en su mayoría con algún tipo de compromiso inmunológico, o infecciones no invasivas en niños.



*H. ducreyi* produce el llamado chancroide o chancro blando, una enfermedad de transmisión sexual, la cual se manifiesta como una úlcera en los genitales con linfadenopatías inguinales. La lesión genital comienza como una lesión maculopapular, transformándose a pústula y luego a úlcera. Para el diagnóstico diferencial con sífilis, además de la morfología de las bacterias presentes en los exudados, es importante considerar que la lesión observada en el chancroide es dolorosa, mientras que la del sífilis es indolora.

Las especies restantes, incluyendo *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* y *H. haemolyticus* se pueden encontrar raramente produciendo infecciones en pacientes inmunocomprometidos.

Para el aislamiento de las especies de *Haemophilus* a partir de muestras clínicas se requiere de medios enriquecidos como agar chocolate, los cuales una vez inoculados, deben ser incubados en una atmósfera con 5-8% CO<sub>2</sub>, con alta humedad y a una temperatura de 35-37°C por un período de 18-24 horas. Luego del período de incubación, las colonias de *Haemophilus* se observan pequeñas, grisáceas y lisas en el agar chocolate. Además de su morfología colonial y microscópica, así como el fenómeno de satelitismo, se pueden efectuar una serie de pruebas bioquímicas para su identificación, incluyendo producción de oxidasa y catalasa, requerimiento de los factores V y X, aumento del crecimiento en presencia de una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>, hemólisis en agar sangre y fermentación de carbohidratos (ver cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características diferenciales de especies de *Haemophilus*.

Especie	Requerimiento de			Hemólisis <sup>1</sup>	Fermentación de <sup>2</sup>				Catalasa
	X	V	CO <sub>2</sub>		Glu	Sac	Lac	Man	
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	V <sup>3</sup>	-	+	+	-	+	V
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>H. segnis</i>	-	+	-	-	D <sup>3</sup>	D	-	-	V
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-

<sup>1</sup> Hemólisis en sangre de caballo.

<sup>2</sup> Glu, glucosa; Sac, sacarosa; Lac, lactosa; Man, manosa

<sup>3</sup> V, variable; D, reacción débil

Adicionalmente a las pruebas bioquímicas para su identificación, se pueden realizar pruebas de biotipificación para *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*, basadas en la detección de las enzimas ureasa y descarboxilasa de ornitina, así como en la producción de indol (ver cuadro 2) Si bien estas pruebas no se realizan rutinariamente debido a la necesidad de contar con medios diseñados específicamente para ellas, la biotipificación permite obtener datos de gran interés epidemiológico.

**Cuadro 2.** Diferenciación de los biotipos de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*.

Especie	Biotipo	Indol	Ureasa	Descarboxilasa de ornitina
<i>H. influenzae</i>	I	+	+	+
	II	+	+	-
	III	-	+	-
	IV	-	+	+
	V	+	-	+
	VI	-	-	+
	VII	+	-	-
	VIII	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	I	-	-	+
	II	-	+	+
	III	-	+	-
	IV	+	+	+
	VI	+	-	+
	VII	+	+	-
	VIII	+	-	-

Particularmente en el caso de *H. influenzae*, además de su identificación a nivel de especie, es fundamental realizar una serotipificación utilizando un suero polivalente, para determinar si la cepa es tipificable o no, y si lo es continuar con la serotipificación utilizando sueros específicos para cada uno de los antígenos capsulares.

## 2. Características del género *Neisseria*

El género *Neisseria* incluye bacterias con morfología de diplococcos Gram-negativos con una reacción positiva a las pruebas de oxidasa y catalasa. Conjuntamente con los géneros *Moraxella* (incluyendo *Branhamella catarrhalis*, actualmente *Moraxella catarrhalis*), y *Kingella* conforman la familia Neisseriaceae. Algunas de las características que permiten diferenciar entre los géneros de la familia Neisseriaceae se muestran en el cuadro 3. En el género *Neisseria*, el cual tiene la mayor importancia clínica dentro de la familia Neisseriaceae, se incluyen las siguientes especies:

*N. gonorrhoeae*  
*N. meningitidis*  
*N. lactamica*  
*N. cinerea*  
*N. polysaccharea*  
*N. flavescens*  
*N. subflava*  
*N. sicca*  
*N. mucosa*  
*N. elongata*

**Cuadro 3.** Características diferenciales de los géneros de la familia Neisseriaceae.

Género	Características			
	Morfología celular	Oxidasa	Catalasa	Ácido a partir de glucosa
<i>Neisseria</i>	Diplococos <sup>1</sup>	+	+	V <sup>3</sup>
<i>Branhamella</i> <sup>2</sup>	Diplococos	+	+	-
<i>Kingella</i>	Cocobacilos	+	-	+
<i>Moraxella</i>	Bacilos	+	+	-

<sup>1</sup> *N. elongata* tiene forma bacilar.

<sup>2</sup> Actualmente la especie *B. catarrhalis* se incluye en el género *Moraxella*.

<sup>3</sup> La producción de ácido depende de cada una de las especies del género.

Los diplococos Gram negativos del género *Neisseria* se asemejan a granos de café y algunos producen cápsula. Las especies de *Neisseria* se caracterizan por ser de metabolismo aerobio y el crecimiento de las especies patógenas se ve favorecido mediante incubación en una atmósfera altamente húmeda y enriquecida a 5-8% de CO<sub>2</sub>. Su temperatura de crecimiento es óptima entre los 35-37°C y tienen requerimientos nutricionales complejos. Algunas especies son capaces de degradar unos pocos carbohidratos, mientras que otras son completamente incapaces de hacerlo, mientras que las especies saprófitas, especialmente, producen pigmentos carotenoides.

Las especies patógenas primarias para el ser humano son *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. *N. gonorrhoeae* es nutricionalmente mucho más exigente que *N. meningitidis*, de manera tal que puede crecer únicamente en medios enriquecidos como agar chocolate, pero no puede crecer en agar sangre, mientras que *N. meningitidis* puede crecer tanto en agar sangre como en agar chocolate. *N. gonorrhoeae* es el agente etiológico de la gonorrea, una enfermedad de transmisión sexual. *N. gonorrhoeae* es un patógeno humano obligatorio y no hay reservorios animales. *N. gonorrhoeae* es una bacteria altamente sensible a la desecación y cambios de temperatura, por lo que la infección se presenta al haber contacto íntimo y prolongado de mucosas y secreciones. El periodo de incubación de la infección varía de 2 a 7 días. Posterior a este período, en hombres se presenta una descarga purulenta abundante, disuria y si no se da tratamiento pueden presentarse complicaciones como epididimitis y prostatitis. En más del 50% de las mujeres se puede presentar una infección asintomática o con sólo un aumento de las secreciones vaginales. En las infecciones sintomáticas hay un aumento de secreción vaginal, disuria, dolor abdominal y alteraciones menstruales.

Las muestras clínicas de origen genital deben ser inoculadas en medios enriquecidos pero selectivos, como el agar Thayer-Martin modificado (MTM) o el agar Martin-Lewis (ML), que contienen cuatro antibióticos que ayudan a suprimir el crecimiento de bacterias contaminantes: vancomicina (MTM, 3 µg/ml; ML, 4 µg/ml), colistina (7.5 µg/ml), lactato de trimetoprim (5 µg/ml) y un agente antifúngico (MTM, nistatina, 13.5 µg/ml; ML, anisomicina, 20 µg/ml). Las colonias de *N. gonorrhoeae* a las 24 horas de incubación son pequeñas, de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, generan una coloración blanca-grisácea y son levantadas y brillantes.

*N. meningitidis* es agente etiológico de bacteremia y meningitis epidémica. *N. meningitidis* puede presentar una cápsula de polisacáridos extracelulares, la cual se ha clasificado en trece diferente serotipos: A, B, C, D, X, Y, Z, W125, 29E, H, 1, K y L. *N. meningitidis* coloniza las

mucosas de tracto respiratorio superior a nivel de epitelio columnar no ciliado. Una vez colonizada la mucosa respiratoria, *N. meningitidis* puede alcanzar sangre y generar una meningococcemia, la cual puede evolucionar a coagulación intravascular diseminada, choque endotóxico y necrosis en glándulas suprarrenales, además de un cuadro de meningitis aguda. La infección invasiva por *N meningitidis* puede provocar rápidamente la muerte del paciente.

Para el aislamiento de *N meningitidis* a partir de muestras clínicas como sangre y líquido cefalorraquídeo se puede utilizar agar sangre y agar chocolate. El crecimiento en agar sangre de un aislamiento primario de *N meningitidis* es variable, aunque posteriormente la bacteria puede adaptarse al medio durante los subcultivos. Luego del período de incubación bajo las condiciones adecuadas, las colonias de *N. meningitidis* son de 1.5 mm de diámetro aproximadamente, redondas, de superficie y borde lisos, con aspecto húmedo y brillante. Algunas colonias son mucoides por la cápsula dando una coloración que va de blanco a gris.

*Branhamella (Moraxella) catarrhalis* es considerada como parte de la flora normal, aunque se ha relacionado como agente causante de infecciones pulmonares y de oído medio. Esta es una bacteria no fastidiosa que crece tanto en agar chocolate como en agar sangre, dando una morfología colonial similar a las de *Neisseria*, pero que puede ser fácilmente diferenciada de las especies de *Neisseria* mediante la prueba de ADNasa.

**Cuadro 4.** Características de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* y *K. denitrificans*.

Característica	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N meningitidis</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>K. denitrificans</i>
Crecimiento en agar sangre	–	V <sup>1</sup>	+	+
Morfología colonial en agar chocolate	Beige a gris, transparente, lisa, 0.5 - 1mm	Beige a gris, transparente, lisa, 1-3 mm	Rosada, opaca, seca, 1-3 mm	Beige a gris, transparente, lisa, 1-2 mm
Ácido a partir de:				
Glucosa	+	+	–	+
Maltosa	–	+	–	–
Lactosa	–	–	–	–
Sacarosa	–	–	–	–
Fructosa	–	–	–	–
Reducción de nitratos	–	–	+	+
ADNasa	–	–	+	–

<sup>1</sup> V, variable.

### 3. Características del género *Campylobacter*.

En la familia Campylobacteriaceae se incluyen los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*. Las especies de *Campylobacter* se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos curvos, en forma de S o de espiral, con un tamaño de 0.2-0.9 µm x 0.5-5.0µm, son no esporulados, móviles por un flagelo en uno o ambos polos de la célula y microaerófilicos (5% O<sub>2</sub> - 10% CO<sub>2</sub> - 85% N<sub>2</sub>). Las especies del género *Campylobacter* asociadas a infecciones en el ser humano incluyen:

*C. jejuni* subsp. *jejuni*

*C. jejuni* subsp. *doylei*  
*C. coli*  
*C. fetus* subsp. *fetus*  
*C. lari*  
*C. upsaliensis*  
*C. hyointestinalis*  
*C. sputorum* biovar *sputorum*  
*C. sputorum* biovar *bubulus*  
*C. rectus*  
*C. mucosalis*  
*C. concisus*



De las especies mencionadas, *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli*, conjuntamente con *C. fetus* subsp. *fetus*, son los tres agentes más frecuentemente asociados a infecciones en el ser humano. *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli* son responsables de infecciones intestinales y clínicamente indistinguibles. La presentación clínica de la infección va desde un cuadro asintomático hasta una infección seria. Los síntomas y signos incluyen fiebre, dolor abdominal y diarrea, con o sin sangre y leucocitos fecales, y duran desde varios días hasta más de una semana. *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli* también son responsables de infecciones extraintestinales, incluyendo bacteremias, infecciones del tracto urinario, meningitis, endocarditis, entre otras. *C. fetus* subsp. *fetus* se asocia principalmente a bacteremia y a infecciones extraintestinales, aunque también puede ser causa de gastroenteritis.

Se puede efectuar un diagnóstico presuntivo de la infección por *Campylobacter* directamente en un frotis de heces cuando se tiñe por Gram, substituyendo la safranina por fucsina o carbolfucsina, gracias a la morfología celular característica y a la presencia de leucocitos fecales, los cuales se observan entre 25-80% de los casos confirmados por cultivo.

Las muestras de heces, o bien, los hisopados rectales, se utilizan para el aislamiento de la bacteria. Estas muestras deben ser inoculadas en medios selectivos, los cuales son medios enriquecidos, como agar sangre, a los cuales se les añade antibióticos como agentes inhibitorios, por ejemplo, suplemento Skirrow o suplemento Bützler. Posteriormente los medios deben ser incubados hasta por 48 horas en condiciones microaerófilas. Dado que *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli* crecen bien a 42°C, se recomienda la incubación a esta temperatura para inhibir algunas otras bacterias contaminantes que crecen a 35-37°C pero no a 42°C. Sin embargo, algunas otras especies de *Campylobacter*, como *C. fetus* subsp. *fetus*, crecen adecuadamente a 35-37°C pero no a 42°C.

La morfología colonial varía grandemente según los medios de cultivos utilizados en el aislamiento. En medios recién preparados, *Campylobacter* produce colonias irregulares, planas, con un color grisáceo. En medios relativamente más viejos y más deshidratados, las colonias de *Campylobacter* son redondas, convexas y brillantes. Usualmente no se observa hemólisis en placas de agar sangre.

La identificación presuntiva de las especies de *Campylobacter* se basa en unas pocas características iniciales, incluyendo su crecimiento en condiciones microaerófilas a 42°C en medios selectivos, su morfología microscópica cuando se tiñen por Gram y la prueba de oxidasa positiva.

La identificación a nivel de especie se logra mediante una serie de pruebas bioquímicas como la reducción de nitratos, la reducción de hipurato y de indoxilacetato y la resistencia a la cefalotina y al ácido nalidíxico (ver cuadro 5).

**Cuadro 5.** Características fenotípicas de especies de *Campylobacter* clínicamente importantes.

Característica	<i>C. jejuni</i> <sup>1</sup>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i> <sup>2</sup>	<i>C. lari</i>
Catalasa	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Hidrólisis de hipurato	+	-	-	-
Hidrólisis de indoxilacetato	+	+	-	-
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+
Crecimiento a 42 °C	+	+	-	+
Crecim. en agar MacConkey	+	+	+	+
Resistencia a ácido nalidíxico	-	-	-	+
Resistencia a cefalotina	+	+	+	+

<sup>1</sup> Incluye únicamente las características de *C. jejuni* subsp. *jejuni*.

<sup>2</sup> Incluye únicamente las características de *C. fetus* subsp. *fetus*

#### 4. Características del género *Helicobacter*

En el género *Helicobacter* se incluye la especie *H. pylori*, una bacteria que habita en la mucosa gástrica del ser humano, así como *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, cuyo habitat natural es la mucosa intestinal. Se han descrito otras especies que habitan la mucosa gástrica de animales, como *H. felis* en gatos y perros, *H. mustelae* en hurones y *H. nemestrinae* en monos. Las especies del género *Helicobacter* se caracterizan por ser bacilos helicoidales, curvos o rectos, no-ramificados, con un tamaño de 0.3-1.0 µm x 1,5-5.0 µm. Son bacterias móviles y de crecimiento microaerófilico, con una temperatura óptima de crecimiento de 35-37°C.

*H. pylori* se asocia a diversas patologías gástricas como gastritis crónica, úlcera péptica duodenal y gástrica y adenocarcinoma gástrico. Su capacidad de residir en el mucosa gástrica se basa particularmente en la producción de una potente ureasa, la cual, mediante la hidrólisis de urea a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, tiende a alcalinizar el medio inmediato circundante de la bacteria, protegiéndola así de la acidez estomacal. Adicionalmente, la morfología, la motilidad y la microaerofilia favorecen la multiplicación de *H. pylori* en el mucus gástrico.

Existe una gran variabilidad genética y fenotípica entre las diferentes cepas de *H. pylori*. Estudios iniciales han demostrado la presencia de ciertos factores de virulencia, como la toxina vacuolizante Vac y proteínas codificadas por el locus *cag*, en cepas aisladas a partir de pacientes con patología gástrica, pero muy infrecuentemente en cepas aisladas de pacientes asintomáticos.

Adicionalmente a *H. pylori*, las especies *H. cinaedi* y *H. fennelliae* se han aislado de pacientes con algún tipo de compromiso inmunológico como agentes de bacteremia, gastroenteritis, proctocolitis, proctitis e incluso meningitis.

*H. pylori* es una bacteria que requiere de medios nutricionalmente ricos como agar Columbia conteniendo 5-7% de sangre de caballo desfibrinada. Dependiendo del grado de contaminación de la muestra se puede agregar al medio de cultivo el suplemento Skirrow para

inhibir el crecimiento de otras bacterias contaminantes. Para su aislamiento a partir de biopsias gástricas, la biopsia es macerada, se inocula en el medio recién preparado y se incuba en condiciones microaerofílicas a 35-37°C por un período de 3 a 7 días. Las colonias de *H. pylori* se observan puntiformes, con un diámetro de aproximadamente 1 mm, translúcidas, no-hemolíticas. La identificación se puede llevar a cabo a partir de colonias típicas mediante la tinción de Gram y las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.

**Cuadro 6.** Características fenotípicas de especies de *Helicobacter* clínicamente importantes.

Característica	<i>H. pylori</i>	<i>H. cinnaedi</i>	<i>H. fennelliae</i>
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Ureasa	+	-	-
Reducción de nitratos	-	+	-
Hidrólisis de hipurato	-	-	-
Hidrólisis de indoxilacetato	-	-	+
Crecimiento a 37 °C	+	+	+
Crecimiento a 42 °C	-	-	-
Resistencia a ácido nalidíxico	+	-	-
Resistencia a cefalotina	-	V <sup>1</sup>	-

<sup>1</sup> V, variable.

## 5. Cronograma de actividades

### Día 1.

#### *Haemophilus*

- Entrega de cultivos.
- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Sembrar la bacteria en una placa de agar chocolate y en una placa de agar sangre. En la placa de agar sangre el inóculo debe ser denso. Posteriormente se realiza una inóculo transversal (en estría) con un cultivo de *Staphylococcus aureus*.
- Incubar las placas por 18-24 horas a 35-37°C en atmósfera con 5-8% CO<sub>2</sub>.
- Inocular fuertemente un caldo urea e incubarlo a 35-37°C por 18-24 horas.

#### *Neisseria*

- Entrega de cultivos.
- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Sembrar la bacteria en una placa de agar chocolate y en una placa de agar sangre.
- Incubar las placas por 18-24 horas a 35-37°C en atmósfera con 5-8% CO<sub>2</sub>.

**Campylobacter**

- Entrega de cultivos en agar sangre.
- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Sembrar la bacteria en dos placas de agar sangre. Incubar a 35-37<sup>0</sup>C y a 42<sup>0</sup>C en condiciones microaerofílicas por 48 horas.

**Día 2.****Haemophilus**

- Realizar la lectura del caldo urea.
- Realizar la lectura del fenómeno de satelitismo.
- Realizar la prueba de catalasa.
- Realizar la prueba de oxidasa.

**Neisseria**

- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Realizar la prueba de catalasa.
- Realizar la prueba de oxidasa.

**Día 3.****Campylobacter**

- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Realizar la prueba de catalasa.
- Realizar la prueba de oxidasa.

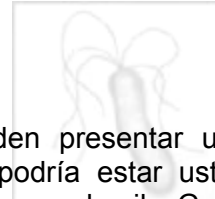
**6. Discusión de resultados.**

1. ¿Cómo se prepara el agar chocolate?

2. ¿En qué consiste el suplemento IsoVitalex<sup>TM</sup>?

3. ¿Para qué sirven cada uno de los cuatro antibióticos que se añaden a los medios selectivos, como Thayer-Martin modificado o Martin-Lewis, para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* a partir de muestras genitales?





4. Algunas especies de los géneros *Acinetobacter* y de *Kingella* pueden presentar una morfología celular muy similar a la de especies de *Neisseria*. ¿Cómo podría estar usted asegurado que la morfología que usted observa es de un coco o de un cocobacilo Gram negativo?

5. ¿Por qué al hacer el aislamiento de *Campylobacter* a partir de una muestra clínica de heces los medios de cultivo deben incubarse a 42<sup>0</sup>C? ¿Qué ventajas y desventajas puede tener este procedimiento?

6. Si aproximadamente 9 de cada 10 personas están infectadas con *H. pylori* en su mucosa gástrica, ¿por qué cree usted que es necesario y/o importante hacer el aislamiento de la bacteria a partir de biopsias gástricas?

## VIII BACILOS GRAM POSITIVOS



### 1. Características del género *Listeria*

El género *Listeria* incluye bacilos Gram-positivos cortos, no esporulados, que aparecen solos o en cortas cadenas. Las colonias son pequeñas, lisas y de color gris. Las especies del género *Listeria* crecen en un rango de temperatura de 1-45°C, con una temperatura óptima entre 30 y 37°C, y producen colonias pequeñas, lisas y de color grisáceo. Tienen la capacidad de crecer en un rango de pH de 5.5-9.5 y a una concentración de NaCl de hasta 10%. Su metabolismo es anaerobio facultativo. Las especies de *Listeria* presentan un movimiento rotatorio de un extremo a otro a temperatura ambiente (22-25°C), pero no a 37°C. La gran mayoría de los aislamientos son catalasa-positiva y oxidasa-negativa. La clasificación antigénica se basa en la tipificación de los antígenos O y H. Actualmente se han descrito las siguientes especies en el género *Listeria*:

*L. grayi*  
*L. innocua*  
*L. ivanovii*  
*L. monocytogenes*  
*L. murrayi*  
*L. seeligeri*  
*L. welshimeri*

Todas las especies de *Listeria* son de amplia distribución en la naturaleza y se encuentran en suelos y plantas, así como también contaminando vegetales, aguas, carnes, mariscos, productos lácteos, etc. Solamente la especie *L. monocytogenes* puede provocar infecciones en seres humanos, mientras que *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se pueden aislar de animales. *L. monocytogenes* produce principalmente septicemia, meningitis y encefalitis en adultos ancianos o con algún tipo de compromiso inmunológico con baja inmunidad celular, como trasplantes, linfomas y SIDA. En mujeres embarazadas producen bacteremia y aborto y en neonatos provocan prematuridad, granulomatosis infantisepticum y meningitis.

### 2. Características del género *Erysipelothrix*.

El género *Erysipelothrix* incluye bacilos Gram-positivos, no-esporulados, no-móviles, que tienden a formar filamentos largos en cultivos viejos. El género *Erysipelothrix* abarca las especies *E. rhusiopathiae* y *E. tonsillarum*, de las cuales únicamente la primera se asocia a infecciones en el ser humano, como infecciones en piel, endocarditis, septicemia y artritis.

La especie *E. rhusiopathiae* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y es un importante patógeno en animales como ganado porcino, aunque puede ser flora normal en muchas especies animales. Su transmisión al ser humano se produce mediante el contacto de personas como veterinarios, carniceros, pescadores y otros con pescados, mariscos, carnes, ganado porcino y aves de corral contaminados.

### 3. Características del género *Corynebacterium*

El género *Corynebacterium* está constituido por un gran número de especies con gran heterogeneidad genética y fenotípica, y se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos, pleomórficos, no-esporulados, no-encapsulados, no-móviles, que pueden presentar gránulos metacromáticos visibles mediante tinción con azul de metileno. Las especies de *Corynebacterium* son catalasa-positiva y están ampliamente distribuidas en el ambiente, pudiéndose encontrar en suelos y agua, como también constituyen parte importante de la flora normal en piel y mucosas del ser humano y de animales.

La especie más importante es *C. diphtheriae*, la cual es el agente responsable de la difteria, una infección del tracto respiratorio superior con efectos sistémicos debido a la producción de la toxina diftérica. La toxina diftérica se encuentra genéticamente codificada por un bacteriófago temperado, por lo cual no todos los aislamientos de *C. diphtheriae* son toxigénicos. *C. diphtheriae* también puede causar difteria cutánea en piel traumatizada.

### 4. Pruebas de identificación para *Listeria*, *Erysipelothrix* y *Corynebacterium*

**Cuadro 1.** Características fenotípicas de los géneros *Listeria*, *Erysipelothrix* y *Corynebacterium*.

Característica	<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>
Morfología microscópica <sup>1</sup>	BG+, cortos, individuales o en cadenas	BG+, conos y/o largos filamentosos	BG+, ligeramente curvos, tipo letra china
Catalasa	+	-	+
Ureasa	-	-	√
Motilidad (25 °C)	+	-	-
Acido a partir de glucosa	+	+	+ <sup>2</sup>
Producción de H <sub>2</sub> S	-	+	-
Reducción de nitratos	- <sup>3</sup>	-	√

<sup>1</sup> BG+, bacilos Gram-positivos.

<sup>2</sup> Algunas especies no utilizan la glucosa.

<sup>3</sup> *L. murrayi* reduce nitratos.

**Cuadro 2.** Características fenotípicas de especies de *Listeria*.

Característica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>
Hemólisis $\beta^2$	+	-	++
Reacción de CAMP			
<i>S. aureus</i> (hemolisina $\beta^+$ )	+	-	-
<i>R. equi</i>	-	-	+
Acido a partir de:			
Glucosa	+	+	+
Lactosa	V	+	+
Manitol	-	-	-
Ramnosa	+	V	-
Ribosa	-	-	+
Sacarosa	-	V	V
Xilosa	-	-	+
Reducción de nitratos	-	-	-

<sup>1</sup> +, >90% de cepas positivas; -, <10% de cepas positivas; V, 11-89 % de cepas positivas

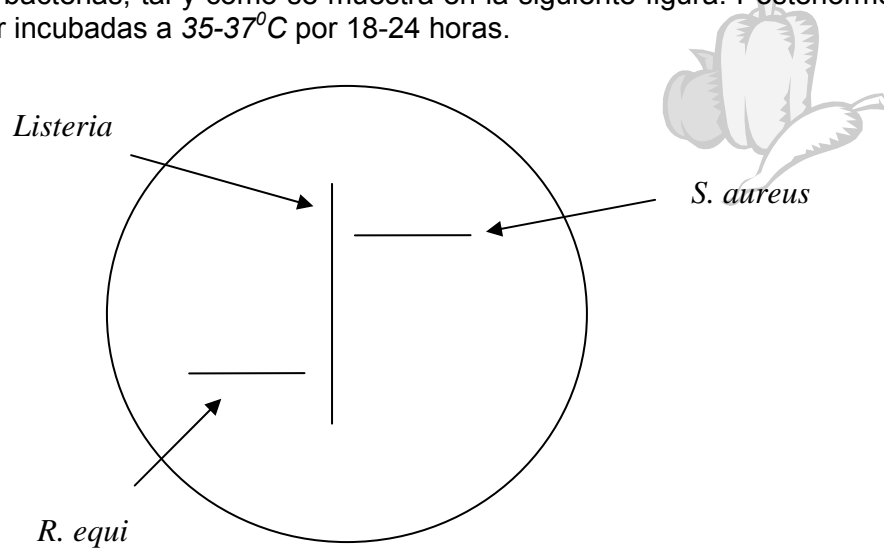
<sup>2</sup> Hemólisis completa; ++, hemólisis amplia; +, hemólisis a veces sólo por debajo de la colonia.

## 5. Cronograma de actividades

### Día 1.

- Entrega de cultivos.
  - Listeria monocytogenes*
  - Listeria ivanovii*
  - Listeria innocua*
  - Erysipelothrix rhusiopathiae*
  - Corynebacterium* sp.
- Describir la morfología colonial.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Realizar las pruebas de catalasa y oxidasa.
- Inocular con cada una de las bacterias los siguientes medios para pruebas de identificación bioquímica:
  - Caldo púrpura de bromocresol conteniendo al 1% los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, ramnosa, sacarosa, lactosa, xilosa, manitol y ribosa.
  - Caldo nitratos.
  - Agar urea de Christensen.
  - Agar TSI.
- Incubar los medios indicados anteriormente a 35-37°C por 18-24 horas.
- Inocular el agar movilidad e incubar a temperatura ambiente por 18-24 horas.
- Inocular una placa de agar sangre preparada con eritrocitos ovinos o bovinos mediante estría para realizar la prueba de CAMP. Para realizar esta prueba, la placa debe ser inoculada en el centro por estría con una especie de *Listeria*. Posteriormente se inoculan por estría perpendicular a la primera una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de la toxina  $\beta$  (esfingomielinasa) y una cepa de *Rhodococcus equi*, sin tocar los sitios donde se

inocularon las otras bacterias, tal y como se muestra en la siguiente figura. Posteriormente las placas deben ser incubadas a 35-37°C por 18-24 horas.



### Día 2.

- Realizar la lectura de las pruebas bioquímicas.
- Realizar la lectura de la prueba de CAMP. Observe la presencia de sinergismo en el efecto hemolítico.

### 6. Discusión de resultados.

1. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de CAMP? ¿Por qué la prueba de CAMP debe realizarse en una placa de agar sangre ovina o bovina y no en una placa de agar sangre humana?
2. ¿Qué característica específica se observó en la prueba de motilidad para *Listeria*?
3. ¿Qué importancia tiene la prueba de TSI para la identificación de *Erysipelothrix*?

## IX STAPHYLOCOCCUS



### 1. Características del género *Staphylococcus*

En el género *Staphylococcus* se incluyen bacterias Gram-positivas que tienen una gran importancia en la medicina, tanto humana como veterinaria, por cuanto tienen la capacidad de causar una gran diversidad de infecciones en el ser humano y en los animales. *S. aureus* es el prototipo del género y es reconocido desde hace decenas de años como un patógeno importante. Sin embargo, recientemente se ha involucrado el grupo de *Staphylococcus* coagulasa-negativa en numerosas infecciones en seres humanos, tanto intra como extrahospitalarias, así como también en animales domésticos y salvajes.

El diámetro de una célula individual de *Staphylococcus* es de 0.7 a 1.2  $\mu\text{m}$ . Típicamente, los *Staphylococcus* muestran una reacción positiva a la tinción de Gram. Sin embargo, células en cultivos viejos o ingeridas por fagocitos pueden mostrarse como Gram-negativas. La clásica morfología de racimos de uva es más evidente en cultivos sobre medios sólidos. Esta morfología se debe a que los *Staphylococcus* se dividen en tres planos perpendiculares sucesivos y a que las células hijas no se separan completamente. En medios líquidos es posible observar cadenas cortas, a diferencia de los *Streptococcus*, los *Staphylococcus* raramente forman cadenas conteniendo más de cuatro células. Los *Staphylococcus*, son no móviles, carecen de flagelos y no forman esporas. Ciertas cepas tienen la capacidad de producir una cápsula extracelular de polisacáridos.

La mayoría de las especies del género *Staphylococcus* son bacterias no fastidiosas que crecen relativamente bien en medios de cultivo sencillos como agar sangre, agar nutritivo, agar tripticosa soya y otros. Las colonias individuales de *Staphylococcus* crecidas sobre agar nutritivo son opacas, con bordes definidos, circulares, convexas y de 1 a 4 mm en diámetro. El clásico color amarillo oro de las colonias de *S. aureus* es debido a la presencia de carotenoides (*aureus* en latín significa oro). La pigmentación es usualmente aparente luego de 18-24 horas de incubación a 37°C, pero es más pronunciada cuando los cultivos son mantenidos a temperatura ambiente por 24-48 horas adicionales. Esta característica es pronunciada también por la presencia de monofosfato o monoacetato de glicerol en el medio de cultivo. La pigmentación no es producida durante el cultivo anaerobio o en cultivos líquidos. Por otra parte, existe una gran variación en cuanto a la pigmentación de las colonias, de un anaranjado profundo a blanco, entre las diferentes cepas de *S. aureus* o incluso entre colonias individuales de una misma cepa. Es importante destacar, sin embargo, que la pigmentación colonial no es una propiedad exclusiva de *S. aureus*, sino que está también presente en otras especies del género incluyendo a *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y otras.

Las especies de *Staphylococcus* son metabólicamente muy activas, por lo que generalmente no requieren la adición de nutrientes específicos. Su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 35-37°C aunque crecen también a temperatura ambiente. Los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y usualmente son productores de catalasa. Excepto por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*, el crecimiento de los *Staphylococcus* es rápido y abundante bajo condiciones aeróbicas. Estos dos miembros del género *Staphylococcus* no son productores de catalasa y crecen mejor en condiciones anaerobias.

La cadena respiratoria de los *Staphylococcus* y de los *Micrococcus* difieren en la

composición de citocromos y menaquinona. La mayoría de los *Staphylococcus* contienen citocromos tipos a y b, mientras que los *Micrococcus* tienen los tipos c y d. Las especies *S. caseolyticus*, *S. lentus* y *S. sciuri* contienen citocromos tipos a, b además de dos citocromos tipo c.

En el género *Staphylococcus* se incluyen actualmente 32 especies, cuyos nombres se muestran en el cuadro 1. Algunas especies están constituidas por dos o más subespecies (ver cuadro 2.).

**Cuadro 1.** Especies que constituyen el género *Staphylococcus*.

<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. vitulus</i>

**Cuadro 2.** Especies de *Staphylococcus* que están constituidas por subespecies.

<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> , <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> , <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae* junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomacoccus* y *Planococcus*. De los cuatro géneros indicados, únicamente *Staphylococcus* puede causar infecciones en el ser humano y en animales regularmente. Sin embargo, miembros de los otros tres géneros podrían ser eventualmente encontrados contaminando muestras clínicas mal tomadas o procesadas, o bien, en otros tipos de muestras no clínicas (alimentos, plantas). Las principales características de los géneros de la familia *Micrococcaceae* y de otros géneros de cocos Gram-positivos se muestran en el cuadro 3.

## 2. Identificación de especies de *Staphylococcus*

Los *Staphylococcus* deben ser diferenciados inicialmente de otros cocos Gram-positivos que pueden estar presentes en los mismos nichos así como en las mismas muestras clínicas, antes de continuar con la identificación hasta nivel de especie y/o subespecie. Diferentes propiedades fenotípicas pueden ser utilizadas para realizar la diferenciación y/o identificación como la morfología colonial, producción de diversas enzimas, resistencia a ciertos antibióticos y la presencia de rutas metabólicas para la utilización de diversos carbohidratos. La morfología colonial es una ayuda muy útil que puede guiar a una identificación presuntiva de *Staphylococcus*. En medio no selectivos, como agar sangre, agar tripticasa soya y otros, la mayoría de los *Staphylococcus* producen colonias de 1-3 mm de diámetro en las primeras 18-

24 horas de incubación, alcanzando a veces hasta 8 mm de diámetro en incubaciones por 5 días a 37°C.

Algunas especies o cepas de *Staphylococcus* crecen muy lentamente en medios no selectivos y requieren hasta 36 horas de incubación para que las colonias se hagan visibles. Este es el caso de *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. equorum* y *S. lentus*. La mayoría de las colonias de *S. aureus* son relativamente grandes (> 5 mm de diámetro), lisas, levantadas, pueden estar pigmentadas (desde amarillo oro hasta anaranjado) y producir hemolisinas que se detectan en agar sangre. Algunas cepas productoras de cápsula tienen una morfología colonial mucoide. En agar manitol-sal, *S. aureus* y otras especies manitol-positivas producen colonias amarillas y el color amarillo se extiende sobre el medio de cultivo conforme difunde el ácido producido por las bacterias. Las colonias de *S. epidermidis* son relativamente pequeñas, alcanzando hasta 5 mm de diámetro, por lo general no son pigmentadas ni hemolíticas con el resto de la morfología colonial siendo muy similar a la de *S. aureus*. El resto de las especies de *Staphylococcus* muestran morfologías coloniales muy similares a las de *S. aureus* y *S. epidermidis* con ligeras variaciones.

Los cocos Gram-positivos aislados de muestras clínicas deben ser inicialmente analizados por la producción de la enzima catalasa. Esta es una prueba muy sencilla pero fundamental para distinguir dos grandes grupos: cocos Gram-positivos catalasa-positivos que incluyen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus*, y cocos Gram-positivos catalasa-negativos con *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Planococcus* entre otros. Como se indicó anteriormente, las especies *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus* son catalasa-negativa. Sin embargo, la producción de catalasa puede ser inducida en *S. saccharolyticus* por la adición de hemina en el medio de cultivo, pero no en *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

Los *Staphylococcus*, a su vez, pueden ser diferenciados de los *Micrococcus* mediante las pruebas de oxidasa y resistencia a la furazolidona y de los *Planococcus* y *Stomatococcus* por la prueba resistencia a la lisostafina. Es importante recordar, sin embargo, que ciertos *Staphylococcus* pueden ser resistentes a la lisostafina debido a sustituciones en residuos de glicina por L-serina o L-alanina en el interpeptido del peptidoglicán, como en el caso de *S. epidermidis* y en *S. sciuri* respectivamente. En caso de duda, se puede realizar la prueba de resistencia a la bacitracina, en la cual los *Staphylococcus* se muestran resistentes, mientras que *Micrococcus* y *Stomatococcus* son sensibles. Adicionalmente las especies *S. sciuri*, *S. lentus* y *S. caseolyticus* tienen citocromos tipo c y son, por lo tanto, oxidasa-positivos. Sin embargo, estas tres especies tienen poca importancia clínica.

La producción de coagulasa es una prueba esencial en la identificación de especies de *Staphylococcus* patógenos causantes de infecciones agudas, como *S. aureus* (aislada de humanos y animales) *S. intermedius* y *S. hyicus* (aisladas de animales). Se han diseñado dos pruebas de coagulasa con diferencias importantes entre sí. La prueba de coagulasa en tubo o coagulasa libre detecta la producción de la enzima estafilo-coagulasa, una proteína de 64 kDa con actividad proteolítica.

La estafilo-coagulasa interactúa con la protrombina formando un complejo denominado estafilotrombina que convierte el fibrinógeno en fibrina. Esta enzima es producida por *S. aureus* incluyendo *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. delphini* y por varias cepas de *S. hyicus*. La prueba de coagulasa en lámina o coagulasa fija detecta la producción de una proteína localizada en la superficie de gran parte de las cepas de *S. aureus* (pero no de *S. aureus* subsp. *anaerobius*), así como también de *S. lugdunensis*, *S. schleferi* y de algunas



cepas de *S. intermedius*, a la cual se le ha dado el nombre de factor de agrupamiento (en inglés *clumping factor*). Esta proteína de 21 kDa media la adhesión de esos *Staphylococcus* al fibrinógeno, lo cual provoca el “agrupamiento” de las bacterias al mezclarse con el plasma. Obviamente, un resultado positivo de la prueba coagulasa en lámina no significa que la bacteria sea productora de estafiloagulasa. La mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones de humanos son positivas tanto por la producción de la estafiloagulasa como por la presencia del factor de agrupamiento. Alrededor de un 3% de cepas de *S. aureus* estafiloagulasa-positivo son factor de agrupamiento-negativo y un porcentaje similar son estafiloagulasa-negativo y factor de agrupamiento-positivo. Estos porcentajes pueden aumentar hasta casi un 50% en cepas de *S. aureus* aisladas de animales.

Una variedad de plasmas pueden ser utilizados para realizar estas pruebas. Sin embargo, plasma deshidratado de conejo conteniendo citrato o EDTA se obtiene comercialmente y es adecuado para la identificación de *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*. El plasma humano es usualmente más satisfactorio para la identificación de *S. lugdunensis* y *S. schleferi*. El plasma humano no debe ser rutinariamente utilizado, a menos que se analice cuidadosamente por su capacidad coagulante y por la presencia de sustancias que puedan inhibir la prueba (anticuerpos, antibióticos).

En adición a las pruebas mencionadas anteriormente, una serie de propiedades metabólicas y actividades enzimáticas específicas pueden ser detectadas en especies de *Staphylococcus*, las cuales son utilizadas en los esquemas de identificación. Entre estas pruebas se incluyen la producción de pigmentos y hemolisinas, crecimiento en condiciones anaerobias, la producción de enzimas como ureasa, termonucleasa, fosfatasa alcalina, ornitina descarboxilasa,  $\beta$ -galactosidasa, producción de acetoina, producción de ácido a partir de carbohidratos, resistencia a novobiocina y a polimixina B. En el cuadro 4 se muestran las reacciones bioquímicas y otras características de especies de *Staphylococcus* clínicamente importantes.

En el mercado se encuentran sistemas bioquímicos comerciales que identifican cierto número de especies de *Staphylococcus* con una exactitud de 70 a más de 90% con simplicidad y relativa rapidez. La exactitud de estos sistemas incrementará con el tiempo con mayores bases de datos y con el desarrollo de pruebas más discriminativas. Los sistemas actualmente disponibles pueden identificar cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. intermedius*. Para ciertos casos es necesario realizar pruebas adicionales no incluidas en los sistemas comerciales incluyendo la coagulasa, el factor de agrupamiento, la actividad ornitina descarboxilasa, crecimiento anaerobio en tioglicolato o resistencia a la novobiocina. Si estas pruebas adicionales no son realizadas por el microbiólogo, la identificación puede ser imposible para ciertas especies. Por ejemplo, en el sistema API-Staph Ident las cepas fosfatasa-negativa de *S. epidermidis* se confunden con *S. hominis*. Para poder distinguir entre ambas especies es necesario realizar la prueba de crecimiento anaerobio en medio de tioglicolato semisólido. El sistema de identificación API-Staph Ident consiste en una serie de pruebas bioquímicas sobre una tira que son inoculadas con una suspensión de la bacteria, según las instrucciones del fabricante. Luego de una incubación de 18-24 horas a 35-37°C los resultados son interpretados y el perfil bioquímico es convertido a un número de siete dígitos. Este número corresponde a una especie o pequeño grupo de especies según la base de datos utilizada para la identificación.

El sistema automatizado de Vitek incuba las tarjetas inoculadas, realiza la lectura e interpreta los resultados, y, con ayuda de su computadora programada, determina la identificación del microorganismo. El sistema Vitek puede proporcionar una identificación

preliminar en unas cuatro horas utilizando la tarjeta de identificación para Gram-positivos. Los programas de este sistema automatizado convierten los resultados en números que son comparados contra una base de datos. Este sistema puede realizar también determinaciones rápidas de susceptibilidad a los antibióticos además de la identificación del microorganismo.

### 3. Cronograma de actividades

#### Día 1.

- Entrega de cultivos.
- Inocular en una placa de agar sangre e incubar a 35-37°C en jarra con candela por 18-24 horas.
- Inocular una placa de agar manitol-sal e incubar 35-37°C por 18-24 horas.
- Realizar frotis y tinción de Gram

#### Día 2.

- Describir la morfología colonial en cada uno de los medios utilizados.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Realizar la prueba de catalasa. Utilizar cepas de *S. aureus* y *Enterococcus* sp. como controles positivo y negativo, respectivamente.
- Realizar la prueba de coagulasa utilizando plasma humano en un tubo 12 mm x 75 mm e inocular densamente con la bacteria. Incubar en baño maría a 35-37°C por 18-24 horas y observar por aparición de un coágulo. Utilizar cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* como controles positivo y negativo, respectivamente.
- Inocular por estría un tubo de agar P conteniendo novobiocina (1.6 µg/ml) e incuba a 35-37°C por 18-24 horas.
- Calentar en baño maría hasta ebullición un tubo de tioglicolato. Dejarlo enfriar a temperatura ambiente e inocular la bacteria hasta el fondo de los tubos. Incubar a 35-37°C por 48 horas.

#### Día 3.

- Realizar la lectura de las pruebas a las 24 horas, según lo indicado, para las siguientes pruebas:

Coagulasa.

Crecimiento en anaerobiosis en caldo tioglicolato.

Crecimiento en agar P conteniendo 1.6 µg/ml de novobiocina.

### 5. Discusión de resultados.

1. ¿Para que se utiliza la prueba de resistencia a la bacitracina en la identificación de *Staphylococcus*?
2. ¿Cuál es la utilidad práctica de la prueba de la resistencia a novobiocina?
2. ¿Por que para las pruebas de utilización de carbohidratos para *Staphylococcus* se utilizan medios sólidos y no medios líquidos?

**Cuadro 3.** Características de *Staphylococcus* y otros géneros relacionados<sup>a</sup>.

Género	%G+C	Metabolismo	Movilidad	Catalasa	Oxidasa	Resistencia a		
						Lisostafina	Furazolidona	Bacitacina
<i>Staphylococcus</i>	30-35	Anaerobio facultativo	-	+	-	-	-	+
<i>Micrococcus</i>	66-75	Aerobio estricto	-	+	+	+	+	-
<i>Planococcus</i>	39-52	Aerobio estricto	+	+	ND	+	-	ND
<i>Stomatococcus</i>	56-60	Anaerobio facultativo	-	±	-	+	-	-
<i>Aerococcus</i>	35-40	Anaerobio facultativo	-	-	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i>	34-46	Anaerobio facultativo	-	-	-	+	-	v
<i>Enterococcus</i>	34-42	Anaerobio facultativo	-	-	-	+	-	+
<i>Peptococcus</i> y <i>Peptostreptococcus</i>	33-37	Anaerobio estricto	-	-	-	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Los géneros *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus* y *Micrococcus* se incluyen dentro de la familia *Micrococcaceae*. Los géneros *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* se incluyen en el cuadro ya que pueden ser encontrados junto con *Staphylococcus* en muestras clínicas.

En algunas especies la catalasa puede ser activada por la adición de hemina.

A una concentración de 200 µg/ml en agar Mueller-Hinton. Las bacterias resistentes (+) crecen en este medio, mientras que las sensibles no lo hacen.

Utilizando discos conteniendo 100 microgramos de furazolidona en agar Mueller-Hinton. Las bacterias resistentes (+) no muestran halos de inhibición, mientras que las bacterias sensibles (-) tienen halos de inhibición de 10 a 25 mm.

Utilizando discos conteniendo 0.04 U de bacitracina en agar Mueller-Hinton. Las bacterias resistentes (+) muestran halos de inhibición de 9 mm o menos, mientras que las bacterias sensibles (-) tienen halos de inhibición de 15 a 35 mm

Símbolos: +, 90% o más de las especies dan reacción positiva, -, 90% o más de las especies dan una reacción negativa; +/-, 90% o más de las especies dan una reacción débil; ND, no determinado.

Las especies *S. caseolyticus*, *S. sciuri* y *S. lentus* son oxidasa-positivas.

**Cuadro 4.** Pruebas para la identificación<sup>a</sup> de especies de *Staphylococcus* con mayor importancia clínica.

Especie	Pigmento	Hemólisis	Crecimiento anaerobio	Oxidasa	Coagulasa		Nucleasa	Fosfatasa alcalina	Ornitina descarboxilasa	Ureasa
					Libre	Fija				
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	v
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	(v)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	(v)	(v)	(+)	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	(v)	v	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	v	(v)	(+)	-	-	-	-	+	-	+
<i>S. epidermis</i>	-	(v)	+	-	-	-	-	+	(v)	+
<i>S. haemolyticus</i>	v	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i>	v	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	-	-	+	-	v	-	+	+	-	v
<i>S. intermedius</i>	-	v	(+)	-	+	v	+	+	-	+
<i>S. kloosii</i>	v	(v)	-	-	-	-	-	v	-	v
<i>S. lugdunensis</i>	v	(+)	+	-	-	(+)	-	-	+	v
<i>S. saprophyticus</i>	v	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	-	(+)	+	-	+	-	+	+	-	ND
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	(+)	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. sciuri</i>	v	-	(+)	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. simulans</i>	-	(v)	+	-	-	-	-	(v)	-	+
<i>S. warneri</i>	v	(v)	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. xylosus</i>	v	-	v	-	-	-	-	v	-	+

<sup>a</sup> Ver comentarios en el texto.

Símbolos: +, 90% o más de las cepas dan reacción positiva; -, 90% o más de las cepas dan reacción negativa; ±, 90% o más de las especies dan una reacción débil; v, 11 a 89% de las cepas dan reacción positiva; ( ), reacción retardada; ND, no determinado.

**Cuadro 4.** Pruebas para la identificación<sup>a</sup> de especies de *Staphylococcus* con mayor importancia clínica (continuación).

Especie	β-Galactosidasa	Producción de acetoina	Reducción de nitratos	Resistencia a Novobiocina	Resistencia a Polimixina B
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	–	+	+	–	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	–	v	v	–	–
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	–	v	+	–	ND
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	–	v	–	+	–
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	+	v	–	+	–
<i>S. epidermis</i>	–	+	+	–	+
<i>S. haemolyticus</i>	–	+	+	–	–
<i>S. hominis</i>	–	v	v	–	–
<i>S. hyicus</i>	–	–	+	–	+
<i>S. intermedius</i>	+	–	+	–	–
<i>S. kloosii</i>	v	v	–	+	–
<i>S. lugdunensis</i>	–	+	+	–	v
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	–	+	–
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	ND	+	+	–	ND
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	(+)	+	+	–	–
<i>S. sciuri</i>	–	–	+	+	–
<i>S. simulans</i>	+	v	+	–	–
<i>S. warneri</i>	–	+	v	–	–
<i>S. xylosus</i>	+	v	v	+	–

<sup>a</sup> Ver comentarios en el texto.

Símbolos: +, 90% o más de las cepas dan reacción positiva; –, 90% o más de las cepas dan reacción negativa; ±, 90% o más de las especies dan una reacción débil; v, 11 a 89% de las cepas dan reacción positiva; ( ), reacción retardada; ND, no determinado.

**Cuadro 4.** Pruebas para la identificación<sup>a</sup> de especies de *Staphylococcus* con mayor importancia clínica (continuación).

Especie	Producción aeróbica de ácido a partir de							
	Arabinosa	Lactosa	Maltosa	Manitol	Manosa	Trehalosa	Sacarosa	Xilosa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	–	+	+	+	+	+	+	–
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	–	–	–	+	+	–	(+)	–
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	–	(v)	+	+	+	–	+	–
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	–	–	(v)	v	(v)	+	–	–
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	–	+	(+)	+	+	+	–	–
<i>S. epidermis</i>	–	v	(+)	–	(+)	–	+	–
<i>S. haemolyticus</i>	–	v	+	v	–	+	+	–
<i>S. hominis</i>	–	v	+	–	–	v	(+)	–
<i>S. hyicus</i>	–	+	–	–	+	+	+	–
<i>S. intermedius</i>	–	v	±	(v)	+	+	+	–
<i>S. kloosii</i>	v	(v)	v	+	–	+	(±)	(v)
<i>S. lugdunensis</i>	–	+	+	–	+	+	+	–
<i>S. saprophyticus</i>	–	v	+	v	–	+	+	–
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	–	v	–	v	+	–	v	–
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	–	–	–	–	+	v	–	–
<i>S. sciuri</i>	v	(v)	(v)	+	(v)	+	+	(v)
<i>S. simulans</i>	–	+	(±)	+	v	v	+	–
<i>S. warneri</i>	–	v	(+)	v	–	+	+	–
<i>S. xylosus</i>	v	v	+	+	+	+	+	+

(continúa)

<sup>a</sup> Ver comentarios en el texto.

Símbolos: +, 90% o más de las cepas dan reacción positiva; –, 90% o más de las cepas dan reacción negativa; ±, 90% o más de las especies dan una reacción débil; v, 11 a 89% de las cepas dan reacción positiva; ( ), reacción retardada; ND, no determinado.

## X STREPTOCOCCUS Y ENTEROCOCCUS



### 1. Clasificación taxonómica de la “familia Streptococcaceae”

En los esquemas taxonómicos tradicionales la “familia Streptococcaceae” incluye cocos Gram-positivos, catalasa-negativos que tienden a crecer en pares o en cadenas, los cuales se diferencian de la familia Micrococcaceae (*Staphylococcus* y *Micrococcus*) por cuanto estos últimos son catalasa-positivos. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes cuestionan la posición taxonómica real de la “familia Streptococcaceae” y han aumentado considerablemente los géneros y las especies relacionadas a *Streptococcus*. La mayoría de los géneros relacionados a *Streptococcus* tienen un metabolismo anaeróbico facultativo (ver cuadro 1), en donde los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* son importantes patógenos para el ser humano y animales. Algunos otros géneros muestran un metabolismo anaeróbico estricto, de los cuales, únicamente los géneros *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* se encuentran en infecciones en el ser humano. Algunas características diferenciales de estos géneros se indican en el cuadro 2.

**Cuadro 1.** Nomenclatura de los cocos Gram-positivos, catalasa-negativos, anaerobios facultativos o anaerobios estrictos.

Anaerobios facultativos		Anaerobios estrictos
<i>Streptococcus</i>	<i>Gemella</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Aerococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Ruminococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Coprococcus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Globicatella</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Helcococcus</i>	

**Cuadro 2.** Algunas características diferenciales de cocos Gram- positivos.

Género	Metabolismo	Catalasa	Movilidad
<i>Streptococcus</i>	Anaerobio facultativo	–	–
<i>Enterococcus</i>	Anaerobio facultativo	–	–/+
<i>Staphylococcus</i>	Anaerobio facultativo	+	–
<i>Peptococcus</i>	Anaerobio estricto	–	–
<i>Peptostreptococcus</i>	Anaerobio estricto	–	–
<i>Leuconostoc</i>	Anaerobio facultativo	–	–
<i>Pediococcus</i>	Anaerobio facultativo	–	–

### 2. Características del género *Streptococcus*.

El género *Streptococcus* incluye un grupo filogenética y fenotípicamente heterogéneo de bacterias que pueden ser frecuentemente encontrados parasitando a humanos y animales.

Algunas especies pueden ser patógenas y otras comensales avirulentos que forman parte de la flora normal del tracto respiratorio y tracto genital, colonizando además piel y membranas mucosas. Las especies del género *Streptococcus* son bacterias anaerobias facultativas esféricas u ovals que miden menos de 2 µm de diámetro. Mediante tinción de Gram se pueden observar como cocos Gram-positivos que se encuentran frecuentemente formando parejas o cadenas. Entre otras características importantes destacan su no-movilidad, carecen de flagelos y no forman esporas, además de que todas las especies reaccionan negativamente a la catalasa. Las especies del género *Streptococcus* son bacterias relativamente fastidiosas con requerimientos nutricionales que varían según la especie. La mayoría de las especies crecen adecuadamente en medios nutritivos enriquecidos con sangre o suero. Algunas cepas requieren de atmósferas elevadas en CO<sub>2</sub> (5-10%), lo cual incrementa el crecimiento y la actividad hemolítica. Luego de 18-24 horas de incubación a 35-37°C, las colonias aisladas miden de 0.3 a 2 mm de diámetro, son opacas, blanquecinas, circulares, de bordes definidos y presentan hemólisis variable. Algunas de las especies más frecuentemente asociadas a cuadros clínicos en seres humanos y animales se muestran en el cuadro 3, cuya clasificación en los diferentes grupos se basa en el análisis del ARNr 16S.

**Cuadro 3.** Ejemplos de especies asignados a los diferentes grupos del género *Streptococcus* basados en el análisis del ARNr 16S.

Grupo	Designación	Especies	Grupo de Lancefield
I	Grupo piogénico	<i>S. pyogenes</i>	A
		<i>S. agalactiae</i>	B
		<i>S. equi</i>	C
		<i>S. dysgalactiae</i>	C
		Varias especies	G
		<i>S. canis</i>	L,M
		<i>S. porcinus</i>	E,P,U,V
II	Grupo <i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>	D,D
III	Grupo <i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. pneumoniae</i>	No aplicable
IV	Grupo <i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i>	No aplicable
V	Grupo <i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	No aplicable
VI	Grupo <i>S. milleri</i>	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i>	No aplicable
VII	Otras especies	<i>S. acidominimus</i> , <i>S. suis</i>	No aplicable R, RS,S,T

Los microorganismos de este género que son patógenos pueden encontrarse produciendo erisipela, fiebre puerperal, infecciones generalizadas, faringitis, piodermia estreptocócica (impétigo), endocarditis aguda y subaguda, infecciones fulminantes por estreptococos del grupo A, síndrome de choque tóxico, infecciones del sistema urinario, de vías biliares, enfermedad post-estreptocócica (fiebre reumática y glomerulonefritis), neumonías, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteremias, meningitis e infecciones nosocomiales.

### 3. Características del género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* incluye a bacterias que son cocos Gram-positivos que se encuentran solos o formando parejas o cadenas cortas similares a los *Streptococcus*, pero que pueden mostrarse en formas cocobacilares cuando son cultivadas en medios sólidos. Las



especies de *Enterococcus* crecen a una temperatura óptima de 35°C, pero la mayoría de las especies pueden crecer entre 10°C y 45°C, crecen en caldo tripticasa soya (CTS) conteniendo 6.5% de NaCl e hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares. Algunas especies de *Enterococcus* son móviles. La expresión de un fenotipo hemolítico es altamente variable entre las diferentes especies de *Enterococcus* así como entre cepas de una misma especie. Por ejemplo, algunas cepas de *E. faecalis* son  $\beta$ -hemolíticas en medios con sangre de conejo o caballo, pero no hemolíticas en medio con sangre de oveja.

*Enterococcus* es un grupo de bacterias muy resistentes que pueden sobrevivir en ambientes muy adversos lo que les permite encontrarse casi en cualquier parte de la naturaleza como en suelo, agua, alimentos, animales, aves e insectos. Diferentes especies de *Enterococcus* pueden encontrarse formando parte de la flora normal del tracto gastrointestinal y tracto genitourinario del ser humano y muchos animales. Las especies clínicamente más importantes son *E. faecalis* y *E. faecium*, con frecuencias de aislamiento de infecciones por *Enterococcus* de 80-90% y de 10-15%, respectivamente. Estas especies de *Enterococcus* son responsables aproximadamente del 10% del total de las infecciones urinarias y del 16% de las infecciones urinarias de origen nosocomial. Adicionalmente, las especies de *Enterococcus* son importantes en las infecciones intraabdominales o pélvicas y de bacteremias, las cuales se presentan en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedad grave que requieren de hospitalización prolongada. La bacteremia puede llevar a endocarditis, en donde la especie *E. faecalis* es el agente más común en los casos de endocarditis por *Enterococcus*.

#### 4. Pruebas bioquímicas de identificación de *Streptococcus* y *Enterococcus*

##### Actividad hemolítica.

La hemólisis observada en los aislamientos de *Streptococcus* y *Enterococcus* en diferentes muestras clínicas es una de las primeras características sugestivas de posibles especies. Algunas especies muestran una hemólisis completa (hemólisis  $\beta$ ) alrededor de las colonias en agar sangre, como *S. pyogenes*, *S. agalactiae* (aunque algunos aislamientos aparecen como no-hemolíticos), *Streptococcus* de los grupos C, F y G, así como algunas cepas de *Enterococcus*, aunque, como se indicó anteriormente, el fenotipo hemolítico en *Enterococcus* es muy variable. Otras especies pueden mostrar una hemólisis incompleta (hemólisis alfa) alrededor de las colonias en agar sangre, incluyendo *S. pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo D y del grupo viridans.

Al realizar la determinación de los patrones hemolíticos de los aislamientos de *Streptococcus* y *Enterococcus* es importante considerar que muchas de sus citolisinas (hemolisinas) son lábiles al O<sub>2</sub>, por lo que las bacterias deben ser inoculadas dentro del agar para proporcionar un ambiente relativamente anaeróbico. Asimismo, los patrones hemolíticos varían grandemente dependiendo del tipo de eritrocito que se ha utilizado en la preparación del agar sangre. Particularmente, los patrones hemolíticos utilizados en la identificación de especies de *Streptococcus* y *Enterococcus* se han determinado usando eritrocitos ovinos o bovinos, los cuales pueden variar si se utilizan eritrocitos humanos, equinos o de conejo.

##### Prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen).

La prueba de CAMP se utiliza para la identificación presuntiva de *S. agalactiae* (grupo B de Lancefield). En esta prueba se observa un efecto sinérgico que se produce al interactuar el factor CAMP producido por cepas de *S. agalactiae* con la hemolisina  $\beta$  de *Staphylococcus aureus*. Ambos son productos extracelulares que difunden en el medio de cultivo para producir

dicho efecto en forma de flecha cuando se utilizan placas de agar sangre preparadas con eritrocitos ovinos o bovinos. Una vez inoculados, los medios de cultivo deben ser incubados a 35-37°C por 18-24 horas. Algunos autores recomiendan no incubar las placas de agar sangre para la prueba de CAMP en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> debido a un probable efecto inhibitorio sobre el sinergismo.

### **Prueba de hidrólisis de esculina.**

Esta prueba se utiliza para la identificación presuntiva de *Streptococcus* del grupo D, como *S. bovis* y *S. equinus*, y de las especies de *Enterococcus*, todos los cuales dan esta prueba positiva. Esta prueba se realiza utilizando un medio llamado agar bilis-esculina, el cual contiene 4% de sales biliares y 1% de esculina. La hidrólisis de la esculina resulta en la formación de glucosa y esculetina. La esculetina en presencia de Fe<sup>3+</sup> forma un complejo de color negro. Por lo tanto, las bacterias que crecen en presencia de las sales biliares e hidrolizan esculina tornan el medio de color negro, generalmente en un periodo de incubación de 18-24 horas a 35-37°C. La presencia de crecimiento pero sin la formación del color negro se considera como una prueba negativa.

### **Prueba de crecimiento (tolerancia) en 6.5% de NaCl.**

Esta prueba permite diferenciar las especies de *Enterococcus* (crecimiento positivo en presencia de 6.5% de NaCl) de los *Streptococcus* del grupo D (crecimiento negativo en presencia de 6.5% de NaCl). El microorganismo en estudio se inocula en un caldo tripticasa soya conteniendo 6.5% de NaCl. Luego de un periodo de 18-24 horas a 35-37°C se observa la presencia o ausencia de crecimiento en el medio de cultivo.

### **Prueba de resistencia al optochin.**

La prueba de resistencia al optochin (hidrocloruro de hidrocupreína) permite la diferenciación de *Streptococcus pneumoniae* (sensible al optochin) de otros *Streptococcus* α-hemolíticos como los *Streptococcus* del grupo viridans (resistentes al optochin). Para la realización de esta prueba el microorganismo en estudio debe ser inoculado densamente en una placa de agar sangre y sobre el inóculo se coloca un disco conteniendo optochin (rotulado con una P), el cual se presiona levemente para que se adhiera a la superficie del medio. Las placas de agar sangre son posteriormente incubados a 35-37°C por un periodo de 18-24 horas en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.

La mayoría de los discos conteniendo optochin disponibles comercialmente tienen un diámetro de 6 mm. Utilizando estos discos de 6 mm para la prueba de resistencia al optochin, un resultado se considera negativo (susceptible) cuando el halo de inhibición mide al menos 14 mm de diámetro. Sin embargo, algunas pocas casas comerciales tienen a disposición discos conteniendo optochin de 10 mm de diámetro. En este caso, un halo de inhibición igual o superior a 16 mm de diámetro se debe interpretar como un resultado negativo (susceptible).

### **Prueba de resistencia a la bacitracina.**

La prueba de resistencia a la bacitracina se utiliza para la diferenciación presuntiva de *Streptococcus* β-hemolíticos del grupo A de Lancefield (*S. pyogenes*) de otros *Streptococcus* β-hemolíticos. *S. pyogenes* se muestra sensible a la bacitracina mientras que otros *Streptococcus* β-hemolíticos son generalmente resistentes a la bacitracina.

Para realizar esta prueba, el microorganismo en estudio se debe inocular densamente en una placa de agar sangre y sobre el inóculo se coloca un disco conteniendo 0.04 unidades de bacitracina (rotulado con una A), el cual se presiona levemente para que se adhiera a la superficie del medio. Las placas de agar sangre son posteriormente incubados a 35-37°C por un período de 18-24 horas en una atmósfera aerobia no enriquecida con CO<sub>2</sub>. La presencia de cualquier halo de inhibición se considera como negativo (susceptible), mientras que el crecimiento bacteriano hasta el borde del disco se considera como positivo (resistente).

**Cuadro 4.** Características preliminares para diferenciar los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*<sup>a</sup>.

Característica	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>
Producción de leucina aminopeptidasa (LAP)	+	+
Producción de pirrolidoniil-arilamidasa (PYR)	-	+
Hidrólisis de esculina	V	+
Crecimiento en CTS conteniendo 6.5% NaCl	V	+
Crecimiento a 10°C	-	+
Crecimiento a 45°C	-	+

<sup>a</sup> ≥ 90% de las cepas dan un resultado positivo; -, ≤ 90% de las cepas dan un resultado negativo; V, 11-89% de las cepas dan un resultado positivo.

**Cuadro 5.** Características diferenciales de *Streptococcus* de los grupos de Lancefield A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*), C, F y G<sup>a</sup>.

Característica	Grupo A	Grupo B	Grupo C, F y G
Hemólisis	β	β, ninguna	β
Prueba de CAMP con <i>S. aureus</i>	-	+	-
Resistencia a bacitracina (0.04 U)	+	-	V
Resistencia a optochin	+	+	+
Resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim (SXT)	-	-	+
Hidrólisis de hipurato	-	+	-
Producción de PYR	+	-	-
Crecimiento en CTS + 6.5% NaCl	-	V	-
Hidrólisis de esculina	-	-	-
Solubilidad en bilis	-	-	-

<sup>a</sup> Ver cuadro 4



**Cuadro 6.** Características diferenciales de *Streptococcus* del grupo D de Lancefield y de *Enterococcus*<sup>a</sup>.

Característica	<i>Streptococcus</i> Grupo D	<i>Enterococcus</i>
Hemólisis	α, ninguna	α, β, ninguna
Prueba de CAMP con <i>S. aureus</i>	–	–
Resistencia a bacitracina (0.04)	+	+
Resistencia a optochin	+	+
Resistencia a SXT	+	–
Hidrólisis de hipurato	–	V
Producción de PYR	–	+
Crecimiento en CTS + 6.5% NaCl	–	+
Hidrólisis de esculina	+	+
Solubilidad en bilis	–	–

<sup>a</sup> Ver cuadro 4

**Cuadro 7.** Características diferenciales de *Streptococcus* del grupo viridans y de *Streptococcus pneumoniae*

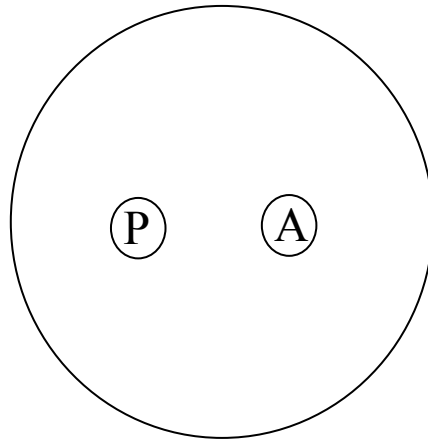
Característica	<i>Streptococcus</i> Grupo viridans	<i>S. pneumoniae</i>
Hemólisis	α, ninguna	α
Prueba de CAMP con <i>S. aureus</i>	–	–
Resistencia a bacitracina (0.04)	V	V
Resistencia a optochin	+	–
Resistencia a SXT	–	–
Hidrólisis de hipurato	V	–
Producción de PYR	–	–
Crecimiento en CTS + 6.5% NaCl	–	–
Hidrólisis de esculina	V	–
Solubilidad en bilis	–	+

## 5. Cronograma de actividades.

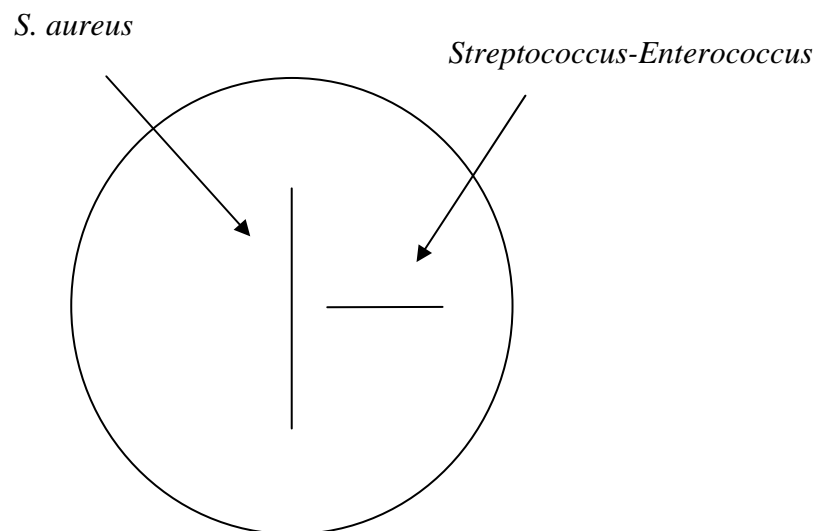
### Día 1

- Entrega de cultivos en placas de agar sangre.
- Describir la morfología colonial
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Describir la morfología microscópica.
- Realizar la prueba de catalasa utilizando una cepa de *S. aureus* y una cepa de *Enterococcus* como controles positivo y negativo, respectivamente.
- Inocular una placa de agar sangre para evaluar la actividad hemolítica. Para esto, inocular una placa de agar sangre preparada con eritrocitos bovinos o equinos (rotulada como CAMP), y realizar varias hendiduras en el agar, de manera que posteriormente al período de incubación ocurra crecimiento por debajo de la superficie del medio. Inocular una placa de agar sangre corriente y procesar de la misma manera que la anterior. Incubar a 35-37°C en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.

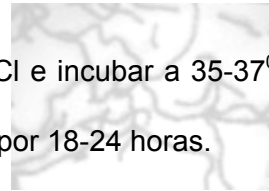
- Inocular una placa de agar sangre para realizar las pruebas de resistencia a bacitracina y a optochin. Para esto, inocular densamente la placa de agar sangre con la correspondiente bacteria. Colocar un disco conteniendo optochin (marcado con una **P** de "pneumococcus") y otro disco conteniendo 0.04 U de bacitracina (marcado con una **A**) sobre el inóculo, de manera que cada uno de los discos queden colocados hacia una mitad de la placa (ver la siguiente figura). Presionar levemente cada uno de los discos para que se adhieran a la superficie del medio. Incubar a 35-37°C por 18-24 horas en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.



- Inocular una placa de agar sangre preparada con eritrocitos ovinos o bovinos mediante estría para realizar la prueba de CAMP. Para realizar esta prueba, la placa debe ser inoculada en el centro por estría con una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de la toxina  $\beta$  (esfingomielinasa). Perpendicularmente al inóculo de *S. aureus* se inocula por estría la especie de *Streptococcus* o *Enterococcus*, sin tocar el sitio donde se inoculó la otra bacteria, tal y como se muestra en la siguiente figura. Posteriormente las placas deben ser incubadas a 35-37°C por 18-24 horas.



- Inocular un tubo conteniendo caldo tripticasa soya con 6.5% de NaCl e incubar a 35-37°C por 18-24 horas.
- Inocular un tubo conteniendo agar bilis-esculina e incubar a 35-37°C por 18-24 horas.

**Día 2.**

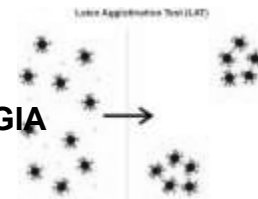
- Realizar la lectura de las pruebas inoculadas en el día 1.
- Realizar la identificación de las cepas utilizando los cuadros 4, 5, 6, 7.

**6. Discusión de resultados.**

1. ¿Cuál es la composición del agar bilis-esculina? ¿Cuál es la función de cada uno de sus ingredientes?

2. ¿Cuál es el mecanismo por el cual el optochin produce la inhibición del crecimiento en *Streptococcus pneumoniae*?

## XI PRUEBAS SEROLOGICAS EN BACTERIOLOGIA



### 1. Rosa de bengala

La brucelosis es responsable de enormes pérdidas económicas en áreas ganaderas alrededor del mundo, así como un riesgo potencial para la salud humana, particularmente en países en vías de desarrollo. Aun cuando los reportes de incidencia y prevalencia de la enfermedad varían considerablemente de país a país, la brucelosis bovina causada principalmente por la bacteria *Brucella abortus* sigue siendo la forma más difundida. Por consiguiente, se hace necesario el establecimiento de programas apropiados para control y erradicación de esta zoonosis.

Las pruebas serológicas son las herramientas más útiles para evaluar la epidemiología de la brucelosis y la eficacia de los programas de vacunación. Los métodos más comúnmente usados incluyen aglutinación, fijación de complemento, inmunodifusión en gel e inmunoensayos enzimáticos. Actualmente, mediante la combinación de una buena información clínico-epidemiológica, junto con el uso de pruebas serológicas presuntivas y confirmatorias, se obtienen mejores resultados en el diagnóstico preliminar de casos sospechosos. Es importante además capacitar al personal médico y de laboratorio, ya que la brucelosis es una entidad de origen insidioso, difícil de identificar, y representa un riesgo de contaminación a nivel de laboratorio si no se siguen procedimientos apropiados con personal conciente del peligro de esta infección bacteriana.

### Materiales y reactivos

- Suspensión concentrada de *Brucella abortus* (cepa Weybridge 99) inactivada por calor y fenol 0.5%, dispersa en buffer de lactato pH 5.0 y teñida con Rosa de Bengala.
- Pipeta automática
- Placa de cerámica blanca lisa
- Aplicadores descartables
- Agitador inclinado (opcional)
- Sueros y antígeno almacenados a 2-8°C. Llevar a temperatura ambiente antes de usar
- Solución salina 0.85 % o PBS 0.01 M pH 7.4

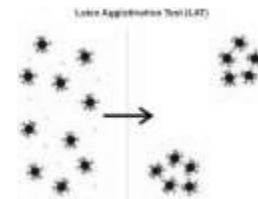
### Procedimiento

#### Animales

1. Colocar una gota de 15 a 30 µl de cada suero en la placa
2. Colocar una gota de 15 a 30 µl de Rosa Bengala a la par de cada suero
3. Mezclar con el aplicador para homogenizar
4. Agitar manualmente o en agitador por 5 a 10 minutos

#### Humanos

1. Hacer diluciones dobles seriadas hasta 1:64 con solución salina o PBS
2. Diluir el antígeno 1:5 con PBS
3. Colocar 15 a 30 µl de cada dilución junto a una cantidad igual de antígeno diluido en la placa
4. Mezclar y agitar de la misma forma que el procedimiento anterior



## Interpretación

No aglutinación: ausencia de anticuerpos

Aglutinación visible: presencia de anticuerpos

## 2. Antiestreptolisina O (ASO)

La estreptolisina O (SO), es una de las toxinas producidas por bacterias del género *Streptococcus pyogenes*, o estreptococos beta hemolíticos del grupo A de Lancefield. Es una citolisina lábil al oxígeno y sensible a colesterol. Debido a la inmunogenicidad de la toxina, es posible determinar los anticuerpos en el suero de pacientes que han estado en contacto con esta bacteria Gram positiva. En personas sanas se pueden encontrar títulos bajos de anticuerpos contra SO, sin embargo, un aumento en el título es indicativo de una infección activa (reciente) como amigdalitis, escarlatina, sepsis puerperal o erisipela.

El primer test serológico para la determinación de ASO fue descrito por Todd en 1932. Esta prueba se basa en la neutralización de la SO mediante cantidades crecientes del suero problema. El exceso de SO no neutralizada, es revelado por medio de hemólisis de los eritrocitos sensibilizados. Se pueden detectar también anticuerpos contra los estreptococos utilizando isoenzimas del ADN, así como mediante una prueba de hemaglutinación, denominada "Streptozyme" en la cuál se adsorben varios antígenos bacterianos sobre eritrocitos (hialuronidasa, estreptokinasa, ADNasa B, etc). El presente método se basa en la detección de anticuerpos anti-estreptolisina O en suero por su reacción contra la SO adsorbida sobre un soporte inerte de látex, lo que produce una aglutinación visible microscópicamente.

## Materiales y reactivos

- Reactivo de látex (Wiener Lab): suspensión de partículas de látex poliestireno recubiertas con estreptolisina O.
- Control positivo y control negativo.
- Sueros no hemolizados almacenados a 2-8 °C. Llevar a temperatura ambiente antes de usar
- Solución salina o PBS
- Pipeta automática de volumen variable
- Placa de vidrio transparente
- Aplicadores descartables

## Procedimiento

### Prueba cualitativa

1. Agitar el reactivo látex varias veces con el gotero
2. Colocar una gota (50 µl) de suero junto a 50 µl de reactivo látex en la placa
3. Mezclar con aplicador hasta homogenizar
4. Agitar por dos minutos y leer

### Prueba semicuantitativa

1. Los sueros positivos en la prueba cualitativa se diluyen seriadamente en viales plásticos o de vidrio con salina o PBS hasta 1:64



2. Repetir el procedimiento anterior

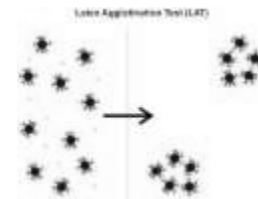
### Interpretación

No aglutinación: suspensión se mantiene homogénea

Aglutinación visible: presencia de anticuerpos ASO

Título: inverso de la máxima dilución a la que se observa una aglutinación visible

ASO (UI/ml) = título × sensibilidad de la reacción (200 UI/ml)



### 3. Prueba para el diagnóstico presuntivo de sífilis (VDRL)

La sífilis es una enfermedad preferentemente de transmisión sexual causada por la espiroqueta *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel con abrasiones leves. La detección y tratamiento de la enfermedad en etapas tempranas es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como sífilis cardiovascular, neurosífilis y sífilis congénita.

Los anticuerpos inespecíficos o también conocidos como no-treponémicos o reagínicos, se presentan en pacientes sífilíticos y están dirigidos contra componentes propios, específicamente de naturaleza lipídica; mientras que los treponémicos o específicos reconocen tanto el *T. pallidum* como cepas de bacterias muy relacionadas a este género. La prueba de VDRL (siglas del inglés Venereal Disease Research Laboratory) es una técnica que detecta anticuerpos anti-cardiolipina, los cuales se pueden encontrar en embarazo, así como en infecciones agudas o crónicas (malaria, tuberculosis, lepra, brucelosis, artritis, cáncer, diabetes, lupus y otras enfermedades autoinmunes).

El principio de esta técnica se basa en la floculación de suspensión antigénica (cardiolipina-lectina-colesterol) con cuando se mezcla con los anticuerpos reagínicos del suero.

### Materiales y reactivos

- Placas o portaobjetos con anillo de parafina o cerámica con un diámetro de 14 mm
- Pipetas automáticas
- Rotador mecánico ajustable a 180 rpm
- Microscopio
- Solución salina 0.85%
- Antígeno: suspensión acuosa de cardiolipina y lecitina purificados en buffer fosfatos con cloruro de colina y EDTA (USR, OMS)
- Sueros o plasmas no bemozados, sin inactivar

### Procedimiento

#### Prueba cualitativa

1. Colocar 50 µl de suero en un anillo de la lámina con micropipeta
2. Agregar una gota de la suspensión del antígeno con el gotero calibrado
3. Poner a rotar las láminas por 4 minutos a 180 rpm.
4. Observar al microscopio sin carro y aumento de 100X con la máxima iluminación.

#### Prueba semicuantitativa

1. Preparar diluciones dobles seriadas del suero hasta 1:32 en solución salina

2. Realizar el procedimiento anterior

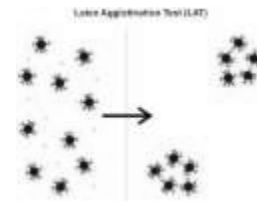
**Interpretación**

R (reactivo): grumos grandes y medianos

DR (débilmente reactivo): grumos pequeños

NR (no reactivo): grumos ausentes

Título: inverso de la máxima dilución que se observe reactiva



## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLINICAS



### XII

#### SELECCION, RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CLINICAS.

##### 1. Consideraciones generales.

En términos de la efectividad en el trabajo que se realiza en el laboratorio de bacteriología médica, nada es más importante que la apropiada selección, recolección y el transporte de una muestra clínica. Cuando la recolección y el manejo de las muestras clínicas no son prioridades, el aporte que puede realizar el laboratorio al diagnóstico y al bienestar general del paciente es verdaderamente pobre. Por consiguiente, tanto el personal del laboratorio así como el personal médico y de enfermería involucrados en el manejo de las muestras clínicas deben entender la importancia de mantener la calidad de la muestra a través de todo su procesamiento, incluyendo la recolección inicial. En este proceso, sin embargo, es responsabilidad de la dirección del laboratorio establecer los lineamientos para la selección, la recolección, el transporte y el almacenamiento de muestras clínicas, además de poner a disposición esta información a todo el personal médico y enfermería, el cual debe incluir criterios específicos con respecto a normas de bioseguridad, selección y recolección, transporte, almacenamiento y recepción en el laboratorio, rotulación y aceptabilidad de las muestras clínicas.

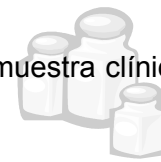
En general se deben seguir las siguientes normas de bioseguridad para la recolección y el transporte de las muestras clínicas:

- Todos los procedimientos para la recolección de muestras clínicas deben realizarse utilizando guantes, gabacha y, cuando sea necesario, bozal o mascarilla.
- Se debe evitar la contaminación de la parte externa de los recipientes. Todos los recipientes para las muestras clínicas deben ser a prueba de derrames, con tapa de rosca preferentemente, y los recipientes conteniendo las muestras clínicas deben ser transportados en bolsas plásticas con un compartimento separado para incluir las solicitudes de análisis y otros documentos. Los documentos nunca deben entrar en contacto con las muestras clínicas.
- No se deben transportar jeringas con agujas al laboratorio. En su lugar, se debe transferir el contenido a un tubo estéril o remover la aguja (con su cobertor colocado en posición), recubrir la jeringa y transportarla en una bolsa plástica.
- Los recipientes con muestras clínicas derramadas no deben ser transportadas al laboratorio ni las muestras clínicas derramadas deben ser procesadas.

##### 2. Selección y recolección de muestras clínicas.

La selección y la recolección de muestras clínicas tienen como objetivo fundamental la obtención de material que sea representativo del proceso infeccioso y que mantenga la integridad y la viabilidad de los agentes infecciosos involucrados. Aunque posteriormente se discuten aspectos específicos con la recolección de los diferentes tipos de muestras clínicas, los siguientes aspectos generales deben ser siempre considerados para la selección y recolección de muestras clínicas:

- Siempre que sea posible, la muestra clínica debe ser recolectada antes de iniciar la terapia con agentes antimicrobianos.



- Se debe evitar la contaminación con flora normal para asegurar que la muestra clínica sea representativa del proceso infeccioso.

### Cuadro 1. Fuentes de contaminación con flora normal

Sitio de infección	Fuente de contaminación
Endometrio	Vagina
Fístula	Tracto gastrointestinal
Infecciones subcutáneas y heridas superficiales	Piel y membranas mucosas
Oído medio	Canal del oído externo
Sangre	Sitio de venipunción
Senos nasales	Nasofaringe
Vejiga	Uretra y perineo

- Se debe seleccionar el sitio anatómico correcto del cual obtener la muestra clínica y utilizar las técnicas y los materiales apropiados para la recolección de las muestras clínicas. Los materiales, instrumentos y equipos deben estar estériles.
- Es necesario especial cuidado en la recolección de muestras clínicas para cultivos por bacterias anaerobias. En general, las muestras de escogencia son las biopsias y los aspirados, mientras que el material infeccioso recolectado por torunda es indeseable. Las muestras clínicas para cultivo por bacterias anaerobias deben ser mantenidas a temperatura ambiente y no deben ser refrigeradas.
- Es esencial recolectar un volumen de muestra adecuado, por cuanto un material en cantidad insuficiente puede provocar resultados falsos-negativos.
- Se deben utilizar solamente recipientes estériles para la recolección de las muestras clínicas, preferentemente de boca ancha, con tapa de rosca para muestras de orina, otros fluidos corporales, esputo y tejidos. Con pocas excepciones, no se deben utilizar placas de Petri para el transporte de muestras clínicas. Los contenedores o recipientes deben ser de un material adecuado, diseñado para promover la sobrevivencia de los agentes bacterianos y para eliminar riesgos de derrame y de bioseguridad.

### Cuadro 2. Aceptabilidad de las muestras clínicas para cultivo por bacterias anaerobias

Muestras aceptables	Muestras Inaceptables
Aspirado (por aguja o jeringa)	Aspirado de traqueostomía
Aspirados de senos	Aspirado endotraqueal
Aspirado endometrial (útero)	Esputo expectorado
Aspirado suprapúbico (orina)	Esputo inducido
Aspirados transtraquales	Fluido seminal o prostático
Bilis	Heces o muestras rectales
Cepillado bronquial (broncoscopía)	Lavado broncoalveolar
DIU <sup>1</sup> para <i>Actinomyces</i> spp.	Loquios
Glándula de Bartholin	Orina obtenida por cateterización
Heces para <i>Clostridium</i> spp. <sup>2</sup>	Orina obtenida por micción
Médula ósea	Torunda cervical
Ovario	Torunda endocervical
Placenta obtenida por cesárea	Torunda faríngea
Torundas y tejidos obtenidos por cirugía	Torunda nasofaríngea
Trompas de falopio	Torunda perineal
	Torunda vulval

<sup>1</sup> DIU, dispositivo intrauterino.

<sup>2</sup> Excepciones: botulismo infantil, infecciones por *C. perfringens* o por *C. difficile*



- Idealmente, todos los recipientes conteniendo muestras clínicas deben ser transportados en bolsas plásticas sellables, con dos compartimientos separados, uno para el recipiente y otro para la documentación.
- La mayoría de las muestras clínicas recolectadas con torundas y que se han secado durante el transporte son inaceptables para su procesamiento.
- En el caso que sea necesario utilizar torundas, se debe hacer una selección adecuada del tipo de material:

Material	Características
Algodón	Los ácidos grasos residuales presentes en algunos tipos de algodón pueden inhibir algunas bacterias, particularmente <i>Chlamydia</i>
Dacron	Adecuado para la recuperación de <i>Streptococcus pyogenes</i>
Alginato de calcio	Adecuado para la recuperación de <i>Chlamydia</i> , pero puede ser tóxico para algunas cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> .

- Si la muestra es recolectada a través de piel intacta (por ejemplo, hemocultivos), se debe lavar la piel con agua y jabón, luego se debe desinfectar en forma centrífuga con etanol al 70% y finalmente de la misma manera con una solución yodada (tintura de yodo al 1-2%).
- Cada muestra clínica debe estar rotulada con el nombre del paciente, número de identificación, el tipo o la descripción de la muestra, el sitio específico de recolección, la fecha y la hora de la recolección y las iniciales del recolector.
- La muestra clínica debe estar acompañada de una solicitud de análisis, la cual debe incluir la siguiente información:
  1. Nombre completo y número de identificación del paciente.
  2. Localización del paciente (servicio, salón, piso, etc.).
  3. Descripción de la muestra, indicando el sitio de recolección según corresponda.
  4. Fecha y hora de la recolección de la muestra.
  5. Diagnóstico -presuntivo o definitivo- del paciente.
  6. Indicación si el paciente está recibiendo o no tratamiento con antimicrobianos.
  7. Otra información pertinente (si la muestra forma parte de una serie de muestras, evaluación de tratamiento, etc.).
  8. Nombre completo, código y número de teléfono del médico tratante.
  9. Firma del médico tratante.



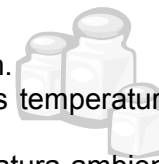
**Cuadro 3.** Muestras que no deben ser procesadas debido a la poca información microbiológica que puede ser obtenida

Tipo de muestra	Alternativa/Comentario
Torundas de quemaduras	Recolectar tejido o aspirado
Descarga de colostomía	No procesar
Torundas de úlceras decúbito	Recolectar tejido o aspirado
Puntas de catéter Foley	No procesar
Aspirado gástrico de neonato	No procesar
Loquios	No procesar
Torundas de abscesos perirrectales	Recolectar tejido o aspirado
Torundas de lesiones gangrenosas	Recolectar tejido o aspirado
Torundas de lesiones periodontales	Recolectar tejido o aspirado
Torundas de úlceras varicosas	Recolectar tejido o aspirado
Vómito	No procesar

### 3. Transporte y almacenamiento de muestras clínicas.

Una vez que las muestras clínicas han sido recolectadas deben ser transportadas al laboratorio lo más pronto posible con el objeto de asegurar la sobrevivencia y el aislamiento de microorganismos fastidiosos y para evitar el sobrecrecimiento de microorganismos menos fastidiosos, disminuir el tiempo de contacto de los microorganismos con agentes anestésicos locales que pudieron haber sido utilizados durante la recolección y proporcionar un diagnóstico más preciso del proceso infeccioso. Las siguientes son recomendaciones generales para el transporte y el almacenamiento de muestras clínicas para cultivo de agentes bacterianos.

- Todas las muestras deben ser transportadas rápidamente al laboratorio, preferentemente antes de dos horas después de la recolección.
- Si la muestra no puede ser procesada inmediatamente debe ser entonces almacenada bajo las condiciones específicas indicadas en los cuadros 4 y 5.
- En términos generales, las muestras clínicas conteniendo probables agentes bacterianos no deben ser almacenadas por más de 24 horas.
- El transporte óptimo de las muestras clínicas, incluyendo los cultivos anaeróbicos, depende principalmente del volumen de muestra obtenido. Las muestras con un volumen pequeño deben ser enviadas al laboratorio en 15-30 minutos luego de recolectadas.
- Las biopsias de tejido pueden ser almacenadas hasta por 24 horas a 25°C en un sistema de transporte anaeróbico.
- Muestras clínicas conteniendo agentes bacterianos altamente sensibles a condiciones adversas deben ser procesadas lo más pronto posible, incluyendo *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* (sensible a bajas temperaturas) y *Shigella* spp.
- Se recomienda que las muestras conteniendo *Shigella* spp. deben ser procesadas inmediatamente para asegurar su recuperación en cultivo.
- Para el transporte de muestras clínicas dentro de un mismo edificio, el personal encargado debe evitar las áreas más transitadas por pacientes o visitantes.
- Considerando lo indicado anteriormente, las muestras clínicas pueden ser almacenadas a 4°C mientras son transportadas al laboratorio, con las siguientes excepciones:
  - Si la muestra de sangre ha sido recolectada directamente en un medio de cultivo, se



- debe colocar inmediatamente ( $\leq 15$  min) a  $35-37^{\circ}\text{C}$  para su incubación.
- Si la muestra clínica puede contener bacterias sensibles a las bajas temperaturas, es mejor mantener la muestra a temperatura ambiente.
  - Muestras de líquido ceforraquídeo deben ser mantenidas a temperatura ambiente o a  $35-37^{\circ}\text{C}$ , excepto que la muestra haya sido sometida a análisis por agentes virales. En este caso, la muestra debe mantenerse a  $4^{\circ}\text{C}$ .
  - Muestras de heces que han sido mezcladas con medios de transporte se mantienen a temperatura ambiente.

#### 4. Recepción y evaluación de muestras clínicas

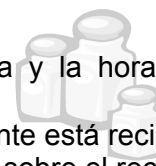
El procesamiento de muestras clínicas de mala o pobre calidad y el reportar los resultados obtenidos de muestras clínicas manipuladas inapropiadamente pueden proporcionar información equivocada al médico tratante, llevándolo a un diagnóstico y/o a un tratamiento erróneos del paciente. Por estos motivos es fundamental que el personal de laboratorio siga estrictamente una serie de lineamientos con respecto a la aceptabilidad y al rechazo de muestras clínicas. El rechazo de una muestra clínica tiene importantes implicaciones para la condición del paciente, incluyendo la recolección de una segunda muestra, la prolongación de la estadía intrahospitalaria y el consecuente aumento en el riesgo de adquirir una infección nosocomial, el retraso en el diagnóstico microbiológico y en el inicio de una correcta terapia con antimicrobianos. El rechazo de una muestra clínica depende de una serie de cualidades de la muestra y este evento puede ocurrir durante la recepción de la muestra en el laboratorio o durante la evaluación de la calidad de la muestra.

##### Procedimiento general para la recepción de muestras clínicas

1. Anotar la fecha y la hora de recepción de la muestra.
2. Verificar que la identificación (nombre y número) del paciente en la solicitud de análisis y en el recipiente que contiene la muestra concuerden.
3. Verificar que la solicitud de análisis contenga toda la información pertinente, incluyendo, además de la información del paciente, la localización del paciente, la descripción de la muestra, la fecha y hora de recolección de la muestra, el posible o supuesto diagnóstico clínico del paciente, indicación si el paciente está recibiendo o no tratamiento con antimicrobianos, otra información pertinente, el nombre completo, código, número de teléfono y firma del médico tratante.
4. Asignar un número de acceso de laboratorio a la muestra clínica.
5. Examinar visualmente la muestra.
6. Revisar y evaluar cuidadosamente la muestra clínica considerando el tipo de análisis solicitado.
7. Determinar las condiciones del recipiente, incluyendo la presencia de medio de mantenimiento, preservantes y condiciones del recipiente (derrames, rupturas).

##### Procedimiento para muestras clínicas sin rotular o mal rotuladas

1. Una muestra clínica sin rotular, mal rotulada o que no concuerda con la información de la solicitud es inaceptable para su procesamiento en el laboratorio.
2. Si una muestra inaceptable puede ser reemplazada por una segunda muestra, notificar por teléfono inmediatamente al servicio, explicando las razones del rechazo y solicitar una segunda muestra.
3. No descartar la primera muestra hasta que se haya confirmado la recolección de la segunda muestra.



4. Documentar el nombre de la persona a quien se le notificó, la fecha y la hora de la notificación.
5. Documentar si es imposible recolectar una segunda muestra o si el paciente está recibiendo terapia con antimicrobianos. En este caso, la información en la solicitud y sobre el recipiente conteniendo la muestra debe ser verificada por escrito por la persona que recolectó la muestra clínica. Si se efectúa esta verificación de la información por escrito, continuar con el procesamiento de la muestra clínica.

#### **Procedimiento para muestras clínicas duplicadas**

1. La gran mayoría de las muestras clínicas duplicadas recibidas en el laboratorio el mismo día no deben ser procesadas, con excepciones importantes como los hemocultivos, líquidos cefalorraquídeos, tejidos y fluidos corporales normalmente estériles (excluyendo la orina), entre otros.
2. No es recomendable mezclar las muestras duplicadas (obtenidas del mismo sitio anatómico) y procesarlas luego como una sola muestra.
3. Si se reciben muestras duplicadas en diferentes momentos del día, se debe notificar inmediatamente al personal médico o de enfermería encargado en el servicio. Si es aceptable no procesar la segunda muestra, se debe reportar **“Muestra duplicada, no se realizó el análisis”** y se refiere el número de la primera muestra que sí fue analizada.
4. No se deben procesar más de tres muestras duplicadas en días consecutivos.

#### **Procedimiento para muestras clínicas derramadas**

1. Si existe evidencia clara que el recipiente está contaminado externamente por la muestra, el recipiente estaba abierto cuando fue recibido o está roto o quebrado, la muestra no debe ser procesada.
2. Proceder a solicitar una segunda muestra, como se indicó anteriormente.

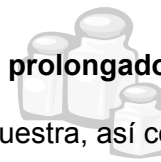
#### **Procedimiento para muestras clínicas contaminadas**

1. Si existe evidencia clara que la muestra recibida está contaminada con otro tipo de muestra (por ejemplo, una muestra de orina contaminada con heces o visceversa), la muestra no debe ser procesada.
2. Solicitar una segunda muestra, como se indicó anteriormente.

#### **Procedimiento para muestras clínicas inapropiadas**

1. No se deben aceptar muestras clínicas que son inapropiadas para el procesamiento bacteriológico.
2. Documentar la recepción de la muestra clínica inapropiada.
3. Notificar por teléfono inmediatamente al personal médico o de enfermería a cargo del paciente, explicando las razones del rechazo.
4. Documentar el nombre de la persona a quien se le notificó, la fecha y la hora de la notificación.
5. Aconsejar al personal médico o de enfermería sobre muestras clínicas alternas apropiadas para procesamiento bacteriológico, dependiendo del tipo de proceso infeccioso y de su localización anatómica.





### Procedimiento para muestras clínicas con un tiempo de transporte muy prolongado

1. Verificar el tiempo transcurrido entre la recolección y la recepción de la muestra, así como las condiciones del transporte y del almacenamiento de la muestra.
2. Documentar la recepción de la muestra clínica inapropiada con un tiempo de transporte muy prolongado.
3. Notificar por teléfono inmediatamente al personal médico o de enfermería a cargo del paciente, explicando las razones del rechazo, y solicitar una segunda muestra.
4. Documentar el nombre de la persona a quien se le notificó, la fecha y la hora de la notificación.
5. Documentar si es imposible recolectar una segunda muestra o si el paciente está recibiendo terapia con antimicrobianos.
6. Si el laboratorio debe procesar una muestra subóptima, se debe realizar un comentario adicional en el reporte como, por ejemplo, ***“Muestra permaneció en el servicio toda la noche antes de ser procesada”***, ***“Muestra fue recibida en recipiente no estéril”***, ***“Los microorganismos pueden no ser los clínicamente representativos por cuanto la muestra fue recolectada y/o transportada inapropiadamente”***.

### 5. Evaluación de la calidad de muestras clínicas

Una vez que las muestras clínicas han sido aceptadas y se les ha asignado un número o código, es importante determinar la calidad de las muestras antes de su procesamiento bacteriológico. La evaluación de la calidad de las muestras es importante para todos los tipos de muestras, aunque es particularmente imperativo en las muestras provenientes del tracto respiratorio inferior, incluyendo muestras de esputo expectorado, aspirados transtraqueales, lavados o cepillados bronquiales. Este procedimiento también es aplicable a cualquier muestra que pueda ser fácilmente contaminada con flora normal de sitios anatómicos adyacentes.

El procedimiento consiste en preparar un frotis a partir de la muestra, realizar una tinción de Gram y una evaluación microscópica de la presencia de células de respuesta inflamatoria (polimorfonucleares [PMN]) y de células epiteliales escamosas (CEE). Una evaluación sistemática de la presencia de estas células permite minimizar el procesamiento de muestras clínicas de baja calidad y, consecuentemente, el reportar resultados incorrectos. Se brindan tres métodos diferentes que pueden ser aplicados igualmente a las diferentes muestras clínicas, aunque la interpretación de resultados que se brinda se refiere a muestras del tracto respiratorio inferior y a muestras de heridas. Es importante considerar, sin embargo, que, en pacientes leucopénicos debido a enfermedad o terapia, la presencia de células epiteliales ciliadas respiratorias indica que la muestra proviene del tracto respiratorio inferior y debe ser, por lo tanto, procesada para su cultivo.

### Procedimiento para evaluar la calidad de muestras clínicas

Preparación y tinción del frotis.

1. Preparar un frotis con las porciones más purulentas de la muestra.
2. Fijar y teñir por Gram.
3. Utilizar el lente de bajo poder seco ( $\times 10$ ) para examinar la preparación por la presencia de PMN y de CEE.

**Método 1. Determinación del valor Q** (del inglés quality [calidad]).

1. Observar 10-20 campos ( $\times 10$ ) y determinar el número promedio de cada tipo de célula



(PMN y CEE) por campo.

2. Calcular el valor **Q**.

3. Realizar la interpretación de los resultados de la siguiente manera:

- Muestras del tracto respiratorio inferior con valores **Q** de + 1, +2 ó +3 son apropiadas para cultivo por bacterias aerobias.
- Muestras del tracto respiratorio inferior con un valor **Q** de 0, -1, -2 ó -3 son inapropiadas para cultivo y se debe reportar **“Muestra no es representativa del tracto respiratorio inferior. Favor enviar una segunda muestra”**.
- Muestras de heridas con un valor **Q** de +3 son apropiadas para cultivo por bacterias aerobias y anaerobias, si se ha solicitado.
- Muestras de heridas con un valor **Q** de +1 ó +2 son apropiadas para cultivo por bacterias aerobias. Si se ha solicitado cultivo por bacterias anaerobias se debe reportar **“Muestra tiene evidencia de contaminación superficial y es inaceptable para cultivo por bacterias anaerobios. Favor enviar una segunda muestra”**
- Muestras de heridas con un valor **Q** de 0, -1, -2 ó -3 son inapropiadas para cultivo y se debe reportar **“Células epiteliales escamosas en la muestra indican la presencia de material superficial que puede contener bacterias contaminantes no relacionadas con la infección. Favor enviar una segunda muestra”**.

#### Método 2. Determinación de la relación de PMNs versus CEEs.

1. Observar al menos 10 campos (x 10).

2. Determinar la relación de PMNs versus CEEs.

3. Realizar la interpretación de los resultados de la siguiente manera:

- Una muestra es aceptable cuando la relación de PMNs versus CEEs es  $\geq 2:1$ .
  - Una muestra es inaceptable cuando la relación de PMNs versus CEEs es  $<2:1$ .
4. Si la muestra es aceptable procesar para cultivo.
5. Si la muestra es inaceptable se debe reportar **“Muestra inaceptable para cultivo. Evaluación celular es consistente con contaminación orofaríngea. Favor enviar una segunda muestra.”**

#### Método 3. Evaluación de la presencia o ausencia de PMNs.

1. Observar al menos 10 campos (x 10).

2. Cuantificar el número de CEEs.

3. Evaluar la presencia o ausencia de PMNs.

4. Realizar la interpretación de los resultados de la siguiente manera:

- Si no se observan PMNs y el número de CEEs es abundante en la tinción de Gram de la muestra de esputo, no se debe examinar el frotis por la presencia de microorganismos.
  - Si se observan PMNs, independientemente del número de CEEs, se debe examinar el frotis a x 100 por la presencia de microorganismos. Particularmente se deben analizar zonas del frotis donde se encuentren los PMNs en mayor número y se deben evitar zonas con evidente contaminación orofaríngea.
5. Reportar la presencia o ausencia de microorganismos predominantes o flora mixta

asociados a las zonas donde se encuentren los PMNs.



### Procedimiento para el manejo de muestras inaceptables

1. Documentar el resultado de la evaluación de la calidad de la muestra clínica.
2. En el caso que la muestra clínica sea inaceptable por su pobre calidad, notificar por teléfono inmediatamente al personal médico o de enfermería a cargo del paciente, explicando las razones del rechazo.
3. Documentar el nombre de la persona a quien se le notificó, la fecha y la hora de la notificación.
4. Solicitar una segunda muestra. Documentar si es imposible recolectar una segunda muestra o si el paciente está recibiendo terapia con antimicrobianos.
5. Si el laboratorio debe procesar una muestra de pobre calidad a solicitud expresa del médico encargado del paciente, se debe realizar un comentario adicional en el reporte como, por ejemplo, ***“Los microorganismos pueden no ser los clínicamente representados por cuanto la muestra fue recolectada inapropiadamente y tiene evidencia de contaminación orofaríngea”***

## **XIII**

### **PROCESAMIENTO DE UROCULTIVOS**



#### **1. Consideraciones generales sobre las infecciones del tracto urinario**

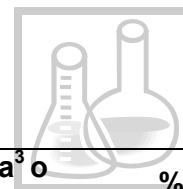
Las infecciones del tracto urinario tienen un gran impacto en la sociedad debido a que son una causa importante de ausentismo laboral y escolar con sus obvias consecuencias económicas. Adicionalmente, las infecciones del tracto urinario son la principal causa de sepsis y choque séptico a nivel comunitario, la principal causa de infecciones intrahospitalarias y la segunda causa en importancia de choque séptico a nivel nosocomial.

La orina dentro del tracto urinario normal es estéril y los microorganismos llegan a colonizar solamente las porciones distales de la uretra. La orina, al pasar por las porciones distales de la uretra durante la micción, se puede contaminar con las bacterias comensales. El número de bacterias presentes en la orina recién recolectada de una persona saludable es relativamente bajo, usualmente  $\leq 10^2$  UFC/ml.

Por diferentes factores que se discuten luego, los microorganismos, principalmente bacterias, pueden llegar a colonizar y provocar un cuadro inflamatorio en diferentes sitios anatómicos del tracto urinario, causando infecciones a nivel de uretra (uretritis), vejiga (cistitis), pelvis y parénquima renal (pielonefritis). En aproximadamente 30% de los casos de pielonefritis se observa una bacteremia concomitante. La colonización y la multiplicación bacteriana a nivel de la vejiga con aparición de números significativos ( $> 10^2$  UFC/ml) de bacterias en orina, pero sin provocar un proceso inflamatorio evidente y, por consecuencia, sin síntomas en el paciente, se denomina bacteriuria asintomática. Otros tipos de infección en el tracto urinario incluyen abscesos perinefríticos, nefritis aguda multifocal, pielitis, tuberculosis renal y prostatitis, entre otros.

La prevalencia de las infecciones bacterianas a nivel del tracto urinario depende de una serie de atributos del hospedero, particularmente del sexo y de la edad del individuo. La prevalencia de las infecciones bacterianas a nivel del tracto urinario depende de una serie de atributos del hospedero, particularmente del sexo y de la edad del individuo. Las infecciones urinarias se presentan, en términos generales, más frecuentemente en mujeres que en hombres por varias razones anatómicas, fisiológicas y conductuales o sociales.

La gran mayoría de las infecciones del tracto urinario son causadas por bacterias que se originan de la flora intestinal normal del mismo individuo. Sin embargo, el espectro de los agentes etiológicos depende, en gran parte, de si la infección es de origen comunitario o de origen nosocomial. En todo caso, *Escherichia coli* es el agente etiológico más importante como responsable tanto de infecciones del tracto urinario comunitarias como de infecciones nosocomiales. Algunos resultados de diferentes estudios sobre los principales agentes bacterianos de infecciones del tracto urinario se muestran a continuación:



### Agentes etiológicos bacterianos de infecciones del tracto urinario<sup>1</sup>

Infección no complicada <sup>2</sup>	%	Infección complicada <sup>3</sup> o nosocomial	%
<i>Escherichia coli</i>	75-85	<i>Escherichia coli</i>	40-50
<i>Staphylococcus coagulasa-negativa</i> <sup>4</sup>	7-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20-25
<i>Proteus</i> spp.	6	Bacterias Gram-positivas <sup>5</sup>	10-15
Otros grupos bacterianos	1-5	<i>Klebsiella</i> spp.	5-10
		<i>Acinetobacter</i> spp.	5-10

<sup>1</sup> Adaptado de diferentes estudios. La lista no es exhaustiva.

<sup>2</sup> Infección adquirida en la comunidad.

<sup>3</sup> Infección en pacientes con anomalías estructurales o neurológicas en el tracto urinario.

<sup>4</sup> Principalmente *Staphylococcus saprophyticus*.

<sup>5</sup> *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

## 2. Atributos del hospedero y otros factores epidemiológicos de las infecciones del Tracto urinario

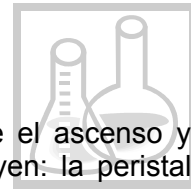
### Rutas de ingreso.

Las bacterias logran llegar hasta diferentes sitios en el tracto urinario básicamente por tres rutas diferentes:

- **Ruta ascendente.** Es la principal vía de inoculación de bacterias provenientes de la flora intestinal que contaminan la región periuretral y uretral distal y que posteriormente ascienden hacia las vías urinarias. Este es la ruta por la cual, por ejemplo, *Escherichia coli* y otras especies de la familia Enterobacteriaceae incluyendo *Proteus*, *Klebsiella* y *Serratia* y especies de *Enterococcus* llegan hasta las vías urinarias.
- **Ruta hematogena.** Por medio de esta ruta, bacterias que se encuentran circulantes en sangre como causantes de una bacteremia, con o sin sintomatología concomitante, llegan hasta el sistema urinario, particularmente a nivel de los riñones, y pueden provocar una infección renal, como los abscesos renales. Esta es una ruta de infección relativamente infrecuente para bacterias provenientes de la flora intestinal, pero puede ser importante para otros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* (en niños), *Salmonella* y *Candida* entre otros.
- **Diseminación directa.** Puede ocurrir una inoculación directa de bacterias de la flora intestinal por medio de fístulas que se originan en el intestino hacia la vejiga o el riñón.

### Mecanismos de defensa del tracto urinario.

Como sistema orgánico, el tracto urinario tiene varios mecanismos de defensa que permite evitar en gran medida la colonización y la infección causada por bacterias. Algunos de los



principales mecanismos de defensa se presentan a continuación.

**Mecanismos mecánicos.** En estos mecanismos previenen mecánicamente el ascenso y la colonización de las vías urinarias por bacterias de origen intestinal e incluyen: la peristalsis uretérica, el vaciado normal de la vejiga y la descamación de células uroteliales.

**Mecanismos químicos.** Un gran número de sustancias están presentes o son secretadas a diferentes niveles en el tracto urinario y tienen algún efecto bacteriostático o bactericida, de manera que ayudan a prevenir inespecíficamente la multiplicación y la colonización bacteriana. En estos mecanismos químicos se incluyen: sustancias antibacterianas presentes en las secreciones prostáticas como  $Zn^{2+}$ , condiciones hiperosmolares en la orina y la médula renal, acidez urinaria, secreción de antígenos sanguíneos como eventuales receptores para adhesinas bacterianas, ausencia del antígeno del grupo sanguíneo P que actúa como receptor para adhesinas tipo P presentes en *Escherichia coli* y otras especies de la familia Enterobacteriaceae potencialmente uropatogénicas.

**Mecanismos inmunológicos.** Diversos mecanismos inmunológicos, específicos e inespecíficos, son importantes en el control de la colonización bacteriana y las infecciones en el tracto urinario, incluyendo: presencia de anticuerpos tipo IgA en las secreciones vaginales, prostáticas, uretrales y vesicales, producción de anticuerpos IgG y consecuente opsonización bacteriana y factores de complemento como mediadores de opsonización y lisis bacteriana.

#### *Atributos del hospedero.*

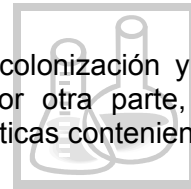
Una gran cantidad de diferentes factores del individuo pueden predisponer o llevar al establecimiento de una infección en el tracto urinario, incluyendo:

- Obstrucción urinaria (congénita o adquirida) como cálculos, tumores, hipertrofia prostática, lo cual puede conducir a un aumento del volumen en estasis urinaria o un vaciado incompleto de la vejiga.
- Factores iatrogénicos como la instrumentación (cateterización).
- Reflujo vesicoureteral.
- Sexo y edad del paciente.
- Embarazo, el cual puede provocar aumento en la retención urinaria, disminución de la peristalsis, aumento en la presión vesical y mayor reflujo vesicoureteral.
- Alteraciones neurológicas como la pérdida de control de esfínteres.
- Lesiones renales preexistentes.
- Diabetes mellitus por pérdida de función leucocitaria y glicosuria.

#### *Prevalencia de las infecciones urinarias.*

Existen múltiples razones por las cuales las infecciones del tracto urinario se presentan mucho más frecuentemente en mujeres que en hombres, incluyendo:

- **Razones anatómicas.** La uretra de la mujer es mucho más corta en mujeres que en hombres (~ 5 cm *versus* ~ 20 cm, respectivamente), además de que desemboca cerca de la vagina y del ano. El orificio uretral presenta una estrecha cercanía anatómica con una región corporal relativamente húmeda por las secreciones y con una temperatura ligeramente más alta, lo cual promueve la multiplicación de aquellas bacterias provenientes del contenido intestinal. Asimismo, las relaciones sexuales provocan traumatismo localizado



y masajeo del tercio distal de la uretra, lo cual también promueve la colonización y la ascensión bacteriana hacia las porciones proximales de la uretra. Por otra parte, la ausencia de la próstata conduce a la obvia carencia de secreciones prostáticas conteniendo sustancias antibacterianas.

- **Razones fisiológicas.** Existen factores fisiológicos por los cuales las infecciones del tracto urinario son más frecuentes en mujeres, incluyendo, por ejemplo, los cambios hormonales que se presentan durante el embarazo, lo cual puede conducir a alteraciones en la flora normal. Asimismo, durante el embarazo y después del parto puede ocurrir una disminución del vaciamiento vesical debido a estiramiento de los tejidos. Conforme mayor sea el número de hijos, mayor será el riesgo a sufrir una infección del tracto urinario. Por otra parte, la presencia de restos de sangre y de otras secreciones, que durante la menstruación permanecen en la región periuretral, puede promover la multiplicación y la colonización bacteriana de la uretra distal y proximal.
- **Razones conductuales o sociales.** Aquí se incluyen los diferentes hábitos y comportamientos de las mujeres:
  - **Hábitos higiénicos:** se debe considerar la manera de limpiarse luego de orinar y de defecar, lo cual puede conducir a la contaminación con material fecal de las porciones distales y proximales de la uretra, así como el uso de tampones o toallas sanitarias y la frecuencia de su cambio.
  - **Hábitos miccionales:** el no orinar, sea por “aguantar ganas”, por rendimiento laboral o por no tomar suficiente cantidad de líquidos, puede conducir a vejigas retencionistas que presentan un mayor volumen total, con un menor volumen de vaciamiento y un mayor volumen residual de orina, en la cual puede ocurrir multiplicación de las bacterias que allí se encuentren.
  - **Hábitos sexuales:** la actividad sexual por sí misma favorece el establecimiento de infecciones en el tracto urinario por masajeo, compresión o traumatismo de la uretra, así como otras prácticas asociadas a la actividad sexual, incluyendo el uso de dispositivos intrauterinos, anticonceptivos orales, sustancias espermaticidas y duchas vaginales.

### 3. Factores de virulencia bacterianos asociados a las infecciones urinarias

Las bacterias causantes de infecciones urinarias generalmente provienen del tracto intestinal donde forman parte de la flora normal. Las cepas uropatógenas se caracterizan por poseer una serie de factores de virulencia que las distinguen de otras cepas bacterianas intestinales no patógenas. Dentro de estas características se deben considerar las siguientes:

- **Motilidad bacteriana.** Con notables excepciones como *Staphylococcus saprophyticus*, especies de *Klebsiella* y *Enterococcus*, la gran mayoría de las bacterias uropatógenas tienen la capacidad de moverse ascendentemente por la uretra hacia la vejiga urinaria. En efecto, las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* y las especies de *Proteus* tienen una alta capacidad de motilidad ascendente, en forma contracorriente a la orina, lo cual facilita grandemente la colonización de la vejiga urinaria.
- **Producción de adhesinas.** Las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* tienen la capacidad de producir diferentes estructuras de adhesión denominadas adhesinas, siendo las más importantes las fimbrias tipo 1 y las fimbrias tipo P. Las fimbrias tipo 1 son producidas por un gran porcentaje de cepas de *Escherichia coli* y de otras especies de la familia Enterobacteriaceae. Las fimbrias tipo 1 median la adhesión a residuos de manosa localizados sobre la mucosa intestinal y sobre la mucosa vesical. Se asume que las fimbrias tipo 1 son responsables de la colonización de la vejiga urinaria y permiten el

establecimiento de las infecciones de las vías urinarias bajas (cistitis). Las fimbrias tipo P reconocen residuos de digalactósido (Gal-Gal) localizados en la superficie de la pelvis renal y, por lo tanto, se presume que las fimbrias tipo P median la colonización de dicho sitio anatómico facilitando el establecimiento de infecciones de las vías urinarias altas (pielonefritis). Las fimbrias tipo P solamente se encuentran solamente en ciertas cepas de *Escherichia coli* denominadas pielonefrogénicas.

- **Producción de ureasa.** La producción de una enzima con actividad urealítica es frecuente en muchos uropatógenos de origen intestinal, incluyendo *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* y *Staphylococcus saprophyticus*. La hidrólisis de urea incrementa la concentración de amonio en la orina con la subsiguiente elevación del pH urinario. El pH urinario elevado puede llevar a una serie de efectos importantes incluyendo la formación de cálculos debido a la precipitación de sales de fosfato de magnesio y amonio. La formación de cálculos puede provocar la obstrucción de las vías urinarias e interferir con la micción y favorece el establecimiento de las infecciones bacterianas. Adicionalmente, la alcalinización de la orina por la generación de amonio favorece la multiplicación y la sobrevivencia bacteriana en el tracto urinario, probablemente porque se logra un pH más adecuado para el crecimiento bacteriano, se obtiene amonio a concentraciones elevadas como una fuente de nitrógeno más asimilable y el amonio puede inactivar el cuarto componente del complemento y prevenir así algunas funciones del sistema inmunológico.
- **Producción de hemolisinas.** La gran mayoría de las especies bacterianas aisladas de infecciones en el tracto urinario son hemolíticas cuando se observa su morfología colonial sobre placas de agar sangre. El caso más estudiado es el de la hemolisina de *Escherichia coli*, una citolisina formadora de poros que tiene la capacidad de interactuar y muchas veces lisar diferentes tipos de células del hospedero. La lisis de los eritrocitos provoca la liberación hemoglobina, la cual sirve como una fuente de hierro, un elemento esencial para la multiplicación bacteriana. Adicionalmente, la interacción de la hemolisina sobre células nucleadas puede alterar la fisiología celular, de manera que se inhiben muchas funciones de leucocitos polimorfonucleares y otras células de respuesta inflamatoria. Tales efectos inhibitorios bloquean la actividad del sistema inmunológico y favorecen entonces la multiplicación de las bacterias en el tracto urinario. Por otra parte, la hemolisina de *Escherichia coli* puede tener un efecto tóxico sobre las células uroepiteliales y del parénquima renal, provocando así un daño directo adicional. Otros casos menos estudiados incluyen las hemolisinas de *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*, las cuales muestran una gran homología con la hemolisina de *Escherichia coli*, la hemolisina de *Serratia marcescens* y la toxina a de *Staphylococcus aureus*, entre otras.
- **Producción de endotoxinas.** El lipopolisacárido (LPS), un componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, tiene un efecto tóxico directo sobre células de respuesta inflamatoria como leucocitos polimorfonucleares, células monocíticas y linfocitos T y B, alterando la producción de una serie de citoquinas involucradas en la respuesta inmunológica. El LPS es uno de los principales inductores de fiebre en los individuos con infecciones bacterianas en las vías urinarias superiores. Otros componentes estructurales bacterianos, como fragmentos de pared celular y ácidos teicoicos provenientes de bacterias Gram-positivas, tienen efectos muy similares a los producidos por el LPS de bacterias Gram-negativas.





#### 4. Manejo clínico de las infecciones urinarias

##### Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario

##### *Diagnóstico clínico:*

Cistitis	Disuria Frecuencia Urgencia Poco volumen de orina Incontinencia Dolor suprapúbico
----------	--

Pielonefritis	Dolor localizado en los flancos, la espalda o el abdomen Fiebre Malestar general Sudoración Dolor de cabeza Náuseas Vómito Postración
---------------	--

##### *Examen general de orina:*

- Prueba de detección de nitritos positiva.
- Presencia de leucocitos.

##### *Urocultivo:*

Recuento del número de microorganismos presentes por mililitro de muestra (UFC/ml).

Identificación del/de los microorganismo(s) aislados.

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos.

- **Pacientes asintomáticos:**

Bacteriuria (10<sup>5</sup> UFC/ml) por una misma especie bacteriana detectada en dos urocultivos en un lapso de 7 a 15 días.

No se da tratamiento con antimicrobianos a los individuos, con excepción de pacientes inmunosupresos y mujeres embarazadas por el riesgo de partos prematuros y mortinatos.

- **Pacientes sintomáticos:**

- **Pacientes con una primoinfección**, definida como la primera infección en la vida o un período superior a seis meses entre las infecciones. Se da tratamiento de rutina.

- **Pacientes con una infección a repetición**, definida como dos o más infecciones en un período igual o inferior a seis meses entre las infecciones. Se puede presentar una de dos condiciones:

- **Reinfecciones**, las cuales ocurren por agentes bacterianos diferentes. A estos pacientes se les da un tratamiento de rutina y un tratamiento de profilaxis por un período mínimo de seis meses. La mayoría de los pacientes (≥ 80%) no presenta problemas de fondo y aproximadamente un 20% de los pacientes tiene alteraciones funcionales o

anatómicas y usualmente son mujeres mayores de 45 años o pacientes diabéticos.

- **Recurrencias** (recaídas), las cuales ocurren por el mismo agente bacteriano. A estos pacientes se les da un tratamiento de rutina y un tratamiento de profilaxis por un período mínimo de seis meses. La mayoría de los pacientes ( $\geq 80\%$ ) presenta algún problema de fondo y requieren de estudios adicionales y las patologías más frecuentemente encontradas en estos pacientes incluyen la presencia de cálculos y de reflujo vesicoureteral. Aproximadamente un 20% de los pacientes no presentan problemas de fondo.

## 5. Muestras de orina para cultivo

Para muestras de orina recolectadas por micción se debe realizar una cuantificación del número de microorganismos presentes por volumen de muestra mediante recuento en medios sólidos, determinando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra. Esta metodología se puede aplicar a muestras de orina recolectadas por cateterización, pero no se debe aplicar a aquellas muestras de orina recolectadas por punción suprapúbica por cuanto se evita la contaminación uretral o periuretral.

En pacientes sintomáticos (dolor al orinar, urgencia, frecuencia) usualmente una única muestra es usualmente suficiente y adecuada para el diagnóstico, siempre y cuando el paciente no haya sido sometido aún a tratamientos con antimicrobianos. En pacientes asintomáticos (bacteriuria asintomática) se pueden necesitar hasta dos o tres muestras recolectadas en tres días consecutivos para poder hacer el diagnóstico de laboratorio.

En casos de que se sospeche de tuberculosis renal, se deben procesar tres muestras recolectadas en tres días consecutivos. Las muestras de orina deben provenir de la primera micción de la mañana para asegurar un mejor diagnóstico. La solicitud de análisis que acompaña la muestra clínica debe indicar si el paciente es sintomático o asintomático, y no debe indicar simplemente **“infección urinaria”** o **“sepsis urinaria”**.

La orina puede ser un buen medio de cultivo para los diferentes microorganismos, tanto los causantes de infecciones como los contaminantes provenientes de la uretra o de la región periuretral. Por lo tanto, las muestras de orina deben ser refrigeradas a 4°C hasta por 24 horas si no van a ser procesadas inmediatamente en el laboratorio.

### Recolección de muestras de orina

*Recolección de muestras de orina por micción (“orina con técnica” “orina a medio chorro”, “orina de segundo chorro”).*

- Se recomienda recolectar la primera orina de la mañana siempre que sea posible, por cuanto proporciona recuentos bacterianos más altos luego de que las bacterias han sido incubadas en la vejiga durante toda la noche.
- No se debe forzar la recolección de la orina, por cuanto la muestra se puede diluir y se pueden obtener recuentos falsamente más bajos que  $10^5$  UFC/ml.

Debido a que es el mismo paciente quien recolecta su propia muestra de orina por micción, es fundamental instruir al paciente adecuadamente para la recolección de muestras de orina por micción, particularmente con respecto a la limpieza de los órganos genitales externos femeninos. La explicación para los pacientes debe ser clara y puede ser verbal y/o escrita. A continuación se da un ejemplo de las instrucciones que se les puede entregar a los pacientes:

**INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS DE ORINA CON TECNICA PARA CULTIVO PARA PACIENTES FEMENINAS**

1. No recolecte la muestra de orina si usted está con la menstruación (regla). De ser así, recolecte la muestra siete días después de que la menstruación le comenzó.
2. Una vez que usted se ha lavado bien sus manos y se ha colocado en una posición como la indicada en el dibujo adjunto, proceda de la siguiente manera:
  - a. Ponga gaza impregnada con jabón líquido en una de sus manos. En su casa utilice un pañito o trapo limpio enjabonado.
  - b. Con la otra mano separe sus labios y proceda a limpiarse la vulva con la gaza o el pañito, de arriba hacia abajo y adentro.
  - c. Proceda a orinar directamente en un frasco estéril, mientras que con una de sus manos mantiene los labios separados. Evite que el frasco toque los labios.
  - d. Tape y rotule el frasco con su nombre y lleve la muestra de orina lo más pronto posible a la recepción del laboratorio.

**INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS DE ORINA CON TECNICA PARA CULTIVO PARA PACIENTES MASCULINOS**

1. Retracte el prepucio (si al paciente no se le ha practicado la circuncisión).
2. Limpie el glande con agua y jabón. En su casa utilice un pañito o trapo limpio enjabonado. Enjuague con abundante agua.
3. Proceda a orinar descartando la primera porción de la orina.
4. Sin detener la micción recolecte la muestra de orina directamente en un frasco estéril. Evite tocar el frasco con el glande.
5. Tape y rotule el frasco con su nombre y lleve la muestra de orina lo más pronto posible a la recepción del laboratorio. Si no es posible llevar la muestra de orina antes de dos horas mantenga la muestra en refrigeración a 4°C.

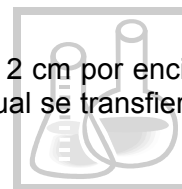
Las muestras de orina deben ser siempre recolectadas en frascos estériles con tapa de rosca, rotulados adecuadamente. Los recipientes conteniendo la muestra deben estar acompañados de una solicitud de análisis con la información completa cuando llegan a la recepción del laboratorio. Se recomienda recolectar una muestra por día hasta un total de tres muestras en tres días consecutivos en pacientes asintomáticos.

***Recolección de muestras de orina por punción suprapúbica.***

La técnica de recolección de muestras de orina por punción (aspiración) suprapúbica evita la contaminación externa. Esta técnica se recomienda para niños pequeños, para pacientes con daño en la espina dorsal y para pacientes en los cuales la interpretación del resultado de una muestra de orina recolectada por micción es difícil. También es la técnica de escogencia para el procesamiento de muestras de orina por bacterias anaerobias, las cuales pueden causar infrecuentemente infecciones de las vías urinarias.

La recolección por punción suprapúbica es una técnica que puede ser realizada únicamente por personal médico. Para la recolección por punción suprapúbica se debe inicialmente descontaminar y anestésiar la zona de la piel, para luego introducir una aguja (22) en la vejiga

llena en la línea media entre la sínfisis púbica y el ombligo, aproximadamente 2 cm por encima de la sínfisis púbica. Se debe recolectar unos 20 ml de muestra de orina, la cual se transfiere a un recipiente estéril adecuado.



#### *Recolección de muestras de orina por cateterización.*

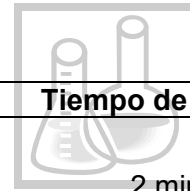
La muestra de escogencia es la orina recolectada del tubo del catéter a través del puerto de recolección. Para la recolección, se debe limpiar el puerto de recolección con un algodón impregnado con etanol al 70%, insertar posteriormente una aguja (21) en el puerto y recolectar la orina con la jeringa. La muestra se transfiere luego a un recipiente estéril apropiado. La orina recolectada de las bolsas así como las puntas de catéter Foley son inapropiadas para el cultivo microbiológico. Durante la recolección de la muestra no se debe desconectar el tubo del catéter de la bolsa de recolección de orina.

#### *Recomendaciones adicionales para la recolección de muestras de orina.*

- No se deben aceptar las siguientes muestras para urocultivo:
  - Puntas de catéter Foley.
  - Muestras de orina recolectadas por micción para examen general de orina, las cuales, generalmente, no se recolectan con la técnica indicada anteriormente ni son transportadas apropiadamente.
  - Sedimento urinario obtenido de una muestra de orina enviada al laboratorio para examen general de orina.
  - Muestras de orina de 24 horas.
  - Muestras de orina recolectadas por micción o por cateterización para bacterias anaerobias.

## **6. Pruebas de tamizaje.**

Se han diseñado diversos métodos rápidos de tamizaje, automatizados y no automatizados, para determinar si la muestra de orina contiene bacterias y/o leucocitos en cantidades significativas. Las pruebas de tamizaje pueden ser necesarias en laboratorios clínicos en los cuales el número de muestras enviadas para urocultivo es muy alto y se requiere algún elemento para discriminar las muestras que pueden dar un cultivo positivo de las que no. Algunas de estas pruebas disponibles se presentan a continuación:



Método	Principio	Tiempo de lectura
<b>Tiras con enzimas</b>		
<i>Glucosa oxidasa</i>	Las bacterias metabolizan la glucosa a ácido glucónico y disminuyen su nivel en orina	2 min
<i>Nitrato reductasa</i>	La mayoría de los bacilos Gram-negativos, así como algunas especies de cocos Gram-positivos, reducen los nitratos a nitritos	2 min
<i>Esterasa</i>	Los leucocitos polimorfonucleares tienen una enzima con actividad esterasa	2 min
<b>Filtración colorimétrica</b>		
FiltraCheck-UTI <sup>TM1</sup>	Las bacterias y los leucocitos polimorfonucleares son retenidos en un filtro y son detectados mediante tinción con safranina	2 min
Bac-T-Screen <sup>TM2</sup>	Igual que FiltraCheck-UTI <sup>TM</sup> , pero requiere de instrumentación para realizar la lectura	2 min
<b>Bioluminiscencia</b>		
UTIscreen <sup>TM3</sup>	El ATP bacteriano es cuantificado con una reacción enzimática de bioluminiscencia con luciferina y luciferasa. Requiere de instrumentación para realizar la lectura	10-45 min

<sup>1</sup> Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio

<sup>2</sup> BioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Missouri

<sup>3</sup> Los Alamos Diagnostic, Los Alamos, Nuevo México

Algunos de los métodos de tamizaje, especialmente las tiras con enzimas, tienen baja sensibilidad y se recomienda su utilización conjuntamente con otros métodos de tamizaje. Se pueden presentar resultados falsos positivos por sustancias interferentes presentes en la orina, orina diluida, pH bajo, interpretación subjetiva y por dejar las muestras de orina a 4°C.

## 7. Métodos microscópicos

Se han descrito varios métodos microscópicos que pueden ser útiles en el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario, particularmente cuando existe la presencia de bacteriuria superior a  $10^5$  UFC/ml.

### DetECCIÓN DE BACTERIURIA.

#### a. Tinción de Gram.

- Colocar 10 µl de la muestra de orina, bien mezclada pero sin centrifugar, sobre un portaobjetos.
- Permitir secar al aire sin esparcir sobre la superficie del portaobjetos.
- Fijar la lámina al calor.
- Teñir por Gram.
- Determinar y reportar el número de microorganismos por campo de inmersión.
- La presencia de uno o más microorganismos por campo de inmersión correlaciona con un recuento de colonias de  $\geq 10^5$  UFC/ml.
- La presencia de abundantes células escamosas y diferentes morfotipos microbianos son indicativos de que la muestra ha sido probablemente contaminada durante la recolección. En este caso, se debe solicitar una segunda muestra.



*b. Tinción con naranja de acridina.*

1. Preparar un frotis como se indicó para la tinción de Gram.
2. Realizar una tinción con naranja de acridina.
3. Determinar el número de microorganismos por campo de  $\times 400$  utilizando un microscopio de fluorescencia. En caso de una morfología dudosa, se puede examinar el frotis con una magnificación de  $\times 1000$ .
4. La presencia de uno o más microorganismos por campo de inmersión correlaciona con un recuento de colonias de  $\geq 10^5$  UFC/ml.

**DetECCIÓN DE PIURIA.**

*Análisis del sedimento urinario.*

El análisis de sedimento urinario por la presencia de leucocitos polimorfonucleares es válido siempre y cuando el procedimiento se haya estandarizado con respecto al volumen de orina centrifugada, la velocidad y el tiempo de centrifugación y el volumen en el cual se resuspende el sedimento.

**8. Cultivo de muestras de orina.**

Como se indicó anteriormente, cuando las muestras de orina son recolectadas por micción puede ocurrir la contaminación de la muestra con bacterias habitantes de la uretra o de la región periuretral. Para descartar el aislamiento y la identificación de una bacteria contaminante como agente causal de una infección urinaria, se recomienda realizar un recuento del número de UFC/ml de muestra de orina recolectada por micción. Este criterio puede ser aplicado también a las muestras de orina recolectadas por cateterización pero, sin embargo, no se aplica cuando la muestra ha sido recolectada por punción suprapúbica, por cuanto se evita la contaminación uretral o periuretral.

Durante mucho tiempo se ha aceptado el criterio que si una persona sufre de una infección urinaria o una bacteriuria asintomática tendrá un recuento de  $\geq 10^5$  UFC/ml de un solo morfotipo colonial, dado que la mayoría de las infecciones urinarias son causadas por un solo tipo de microorganismo, mientras que una persona sin infección urinaria tendrá un recuento de  $<10^2$  UFC/ml de dos o más morfotipos bacterianos. Sin embargo, como se discute más adelante, si una persona con sintomatología urinaria tiene un recuento de  $<10^5$  UFC/ml, el microorganismo aislado puede tener importancia clínica y no puede ser simplemente descartado por haber resultado de un recuento más bajo.

**Procedimiento.**

*a. Recuento por dilución en tubo.*

1. Añadir 0.1 ml de la muestra de orina (bien mezclada y sin centrifugar) a 9.9 ml de solución salina estéril ( $10^{-2}$ ).
2. Mezclar bien y transferir 0.1 ml de esta dilución a cada una de las placas con medio ( $10^{-3}$ ).
3. Distribuir bien el inóculo sobre la superficie del agar utilizando un asa estéril o una espátula de Drigalski.
4. Incubar las placas de los medios inoculados a 35 a 37°C por 18-24 horas. Las placas de agar sangre deben ser incubadas en jarra con candela.
5. Luego del periodo de incubación determinar el número de colonias en la superficie y el número de UFC/ml multiplicando el número de colonias por el factor de dilución ( $10^3$ ).



*b. Recuento por inoculación directa con asa calibrada.*

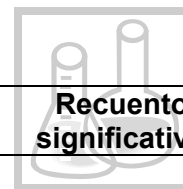
1. Introducir verticalmente un asa calibrada de 0.01 ml (10  $\mu$ l) o de 0.001 ml (1  $\mu$ l) estéril justamente por debajo de la superficie de la muestra de orina (bien mezclada y sin centrifugar).
2. Inocular por estría sobre toda la superficie del medio de cultivo.
3. Sin flamear nuevamente el asa, repetir el procedimiento para el segundo medio de cultivo a utilizar.
4. Incubar las placas de los medios inoculados a 35 a 37°C por 18-24 horas. Las placas de agar sangre deben ser incubadas en jarra con candela.
5. Luego del período de incubación determinar el número de colonias en la superficie del medio de cultivo y el número de UFC/ml multiplicando el número de colonias por el factor de dilución ( $10^2$  para un inóculo de 0.01 ml [una colonia representa 100 UFC/ml],  $10^3$  para un inóculo de 0,001 ml [una colonia representa 1,000 UFC/ml]).

*c. Recomendaciones para la inoculación e incubación de las placas.*

- Se recomienda utilizar para cada una de las muestras de orina una placa de agar sangre y una placa de agar MacConkey. El agar MacConkey puede ser alternativamente sustituido por agar Eosina-Azul de Metileno).
- No se deben sembrar *medias placas* No se deben inocular dos o más muestras en una misma placa por el riesgo de provocar una contaminación cruzada de las muestras, particularmente por el fenómeno de swarming provocado por especies de *Proteus*.
- La superficie del medio de cultivo debe estar libre de humedad evidente, por lo que se recomienda incubar los medios a 35 a 37°C por 1-2 horas antes de ser inoculados.
- La incubación de las placas a 35 a 37°C en condiciones se realiza en condiciones anaeróbicas solamente cuando la muestra ha sido recolectada por punción suprapúbica.

**Examen de los medios de cultivo.**

1. Examinar las placas que han sido incubadas a 35 a 37°C por 18-24 horas.
2. Si no se observa crecimiento y la muestra ha sido recolectada por micción o por cateterización, reportar:
  - **“No se observa crecimiento >  $10^3$  UFC/ml”**, si se inocularon las placas por dilución en tubo ( $10^{-3}$ ) o con asa calibrada de 1  $\mu$ l.
  - **“No se observa crecimiento >  $10^2$  UFC/ml”**, si se inocularon las placas con asa calibrada de 10  $\mu$ l.
3. Si no se observa crecimiento y la muestra fue recolectada por punción suprapúbica, incubar las placas por 18-24 horas adicionales.
4. Si se observan colonias muy pequeñas o diminutas, incubar las placas por 18-24 horas adicionales.
5. Si no se observa crecimiento y este resultado no correlaciona con lo observado en la tinción de Gram de la muestra o con la condición clínica del paciente, incubar las placas por 18-24 horas adicionales.
6. Sin tampoco se observa crecimiento luego de una incubación de 48 horas y este resultado no correlaciona con lo observado en la tinción de Gram de la muestra o con la condición clínica del paciente, solicitar una muestra de orina recolectada por punción suprapúbica para hacer un cultivo para bacterias anaerobias.
7. Si se observa crecimiento, examine los cultivos por número de colonias (UFC/ml) y por los diferentes morfotipos coloniales.
8. Realizar cuantificaciones adicionales según la condición clínica del paciente, como se muestra a continuación:



Tipo de infección	Sintomatología	Agentes	Recuento significativo
Pielonefritis	Fiebre, dolor en flancos, escalofríos, náuseas, cilindros leucocitarios	Bacilos Gram-negativos <i>Staphylococcus aureus</i>	$\geq 10^5$
Cistitis	Asintomática o disuria y frecuencia	<i>Escherichia coli</i> y otros bacilos Gram-negativos	$\geq 10^5$
Prostatitis	Dolor dorsal, fiebre, escalofríos	Bacilos Gram-negativos	$\geq 10^5$
Uretritis	Disuria y frecuencia	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	$\geq 10^5$

### Interpretación de los resultados.

1. El criterio de un recuento de  $\geq 10^5$  UFC/ml se puede aplicar a la mayoría de las muestras de orina recolectadas por micción y enviadas para cultivo.
2. En el caso de recuentos inferiores a  $10^5$  UFC/ml se puede aplicar la siguiente guía de análisis de los resultados:

Recuento	Condición/Tipo de muestra	Organismos	Procedimiento a seguir
$\geq 10^5$	Orina por micción	Cultivo puro	Identificación y PSA
	Orina por micción Sintomatología positiva	Dos morfotipos coloniales	Identificación y PSA
		Más de dos morfotipos coloniales	Posible contaminación. Reportar posible contaminación y solicitar nueva muestra
$10^4$	Orina por cateterización Sintomatología positiva	Dos morfotipos coloniales	Identificación y PSA
		Más de dos morfotipos coloniales	Posible contaminación. Reportar posible contaminación y solicitar nueva muestra
$10^3$	Orina por cateterización	Cultivo puro	Identificación y PSA
	Hombre sintomático	Cultivo puro	Identificación y PSA
$10^2$	Punción suprapúbica	Cualquier número de morfotipos	Identificación y PSA
	Mujer sintomática	Cultivo puro de bacilo Gram-negativo	Identificación y PSA





## 9. Cronograma de actividades

### **Día 1**

- Entrega de muestras de orina para urocultivo.
- Realizar tinción de Gram.
- Realizar dilución 1:1000 de la muestra de orina como se describe anteriormente.
- Sembrar en agar sangre y MacConkey.
- Incubar a 35 C por 24 horas.

### **Día 2**

- Observar morfología colonial.
- Realizar la tinción de Gram de colonias.
- Subcultivar en ATS y agar sangre.
- Realizar caracterización bioquímica según corresponda al grupo bacteriano.

### **Día 3**

- Continuar pruebas bioquímicas.
- Leer los resultados.
- Mantener en ATS para realizar PSA.

## 10. Referencias

Albers, A. C., R. D. Fletcher. 1983. Accuracy of calibrated-loop transfer. *J. Clin. Microbiol.* 18:40-42.

Kass, E. H. 1956. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 69:56-63.

Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. C. Winn. 1997. *Diagnostic Microbiology*, 5<sup>th</sup> edition. Lippincott. Philadelphia.

Miller, y. L., J. B. Kaper, D. A. Portnoy, R. R. Isberg (editors). *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C.

Pezzlo, M. 1995. Urine culture procedure, section 1.17 In H. D. Isenberg (editor), *Clinical Microbiology Procedures handbook*, Vol. 1. American Society for Microbiology Press. Washington.

## XIV PROCESAMIENTO DE COPROCULTIVOS



### 1. Consideraciones generales

El tracto gastrointestinal contiene una flora normal bacteriana muy amplia y diversa. Aun cuando la acidez del estómago previene la colonización, muchas especies pueden sobrevivir al pasaje por el estómago y se convierten en flora residente del tracto gastrointestinal bajo. Normalmente el intestino delgado contiene una flora escasa (estreptococos, lactobacilos y levaduras, de  $10^1$  a  $10^3$  /ml), pero conforme se alcanza el íleon distal, los recuentos se aproximan a  $10^6$  -  $10^7$  /ml, y se encuentran enterobacterias y *Bacteroides* spp.

Los bebés son colonizados en las primeras horas de nacido por bacterias de la flora normal epitelial, particularmente estafilococos, corinebacterias, bifidobacterias, clostridios, lactobacilos y estreptococos. Con el tiempo, el contenido de la flora intestinal cambia. La flora normal del intestino grueso del adulto comprende principalmente especies anaerobias, como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus*. La razón de especies anaerobias a aerobias, que incluyen enterobacterias, enterococos y otros estreptococos, es de 1000:1. El 80% del peso seco de heces de un adulto normal consiste en bacterias, las cuales son principalmente anaerobias ( $10^{11-12}$ /g) y aerobias (*E. coli*,  $10^8$ /g, *Proteus*, *Klebsiella*, enterococos y otras especies,  $10^{5-7}$ /g).

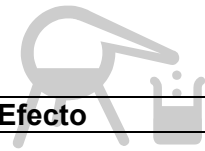
Después de una terapia antimicrobiana, el intestino grueso puede ser colonizado por patógenos nosocomiales, tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, y bacilos Gram-negativos resistentes, lo cual influencia la flora de cualquier infección intraabdominal subsecuente.

### **Patogenia de la infección gastrointestinal.**

Los agentes etiológicos de infecciones del tracto gastrointestinal pueden causar enfermedad por cuatro mecanismos básicos:

- I. Producción de toxinas que afectan la secreción de fluidos, función celular, o función neurológica. El cuadro 1 resume los principales agentes bacterianos involucrados en la producción de toxinas que actúan sobre el tejido intestinal.

Las neurotoxinas usualmente se ingieren como toxinas preformadas que actúan sobre el sistema nervioso autónomo (enterotoxina b, toxina emética) o en las uniones neuromusculares (toxina botulínica). Las enterotoxinas, por su parte, poseen un efecto directo sobre la mucosa intestinal que estimula en forma potente la secreción de fluidos. Estas actúan principalmente sobre el yeyuno y el íleon proximal, donde se lleva a cabo la mayor parte del transporte de fluidos. Finalmente, las citotoxinas actúan destruyendo la estructura de las células intestinales individuales. Cuando estas células son destruidas, se desprenden de la superficie de la mucosa, dejándola desprotegida y con las funciones de absorción o secreción dañadas. Además, la destrucción epitelial despierta una fuerte respuesta inflamatoria que acentúa el daño tisular (disentería).

**Cuadro 1** Enfermedades entéricas asociadas con toxinas.

Organismo productor	Fuente	Efecto
<b>Neurotoxinas</b>		
<i>Clostridium botulinum</i>	Alimentos enlatados, miel, Vegetales y frutas	Parálisis flácida
<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxina b)	Carne, lácteos, repostería, jamón, ensaladas con huevo.	Vómito y diarrea.
<i>Bacillus cereus</i> (toxina emética)	Arroz, carne, pollo, vegetales y postres.	Vómito y diarrea.
<b>Enterotoxinas secretoras</b>		
<i>Vibrio cholerae</i>	Mariscos, agua	Alteración metabólica celular
<i>E. coli</i> ET (LT, Sta y STb)	Carnes, agua	
<i>Clostridium perfringens</i> (A)	Carnes, salsas, aderezos, comida mexicana	Vómito y diarrea
<i>Salmonella</i>	Carnes, huevos	Diarrea
<i>Campylobacter spp.</i>	Pollo, carnes	Diarrea
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ensalada de papa, huevo, vegetales.	Diarrea
<b>Citotoxinas</b>		
<i>Escherichia coli</i> EH (SLTI y SLTII)	Carne	Destrucción celular
<i>Clostridium difficile</i> (A y B)	Carne	Inflamación
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Mariscos	Disentería
<i>Clostridium perfringens</i> (A)	Carnes, salsas, aderezos, comida mexicana	Vómito y diarrea
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pollo, carnes	Diarrea con sangre y moco
<i>Shigella</i>	Ensaladas de papa, huevo, vegetales	Disentería
<i>Helicobacter pylori</i>	?	Daño a mucosa gástrica
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	Mariscos, agua salada	Diarrea con sangre y moco
<i>S. aureus</i>	Carne, lácteos, repostería, jamón, ensaladas de huevo	Diarrea

II. Crecimiento dentro o cerca de células de la mucosa intestinal, causando disfunción. La mayoría de los virus actúan de esta manera, principalmente en el intestino delgado, y los síndromes diarreicos no siempre están asociados con la presencia de sangre o leucocitos. Ejemplos de virus que causan cuadros diarreicos son hepatitis A, B y C, rotavirus, agentes Norwalk y adenovirus.

III. Invasión del epitelio mucoso, causando destrucción y ocasionalmente invasión y diseminación sistémica por el torrente sanguíneo. Ciertos parásitos, como *Entamoeba*

*histolytica* y *Balantidium coli* invaden el epitelio del colon y causan disentería. Otros parásitos adquiridos por ingestión, como *Trichinella* y *Schistosoma*, pueden causar diarrea sanguinolenta transitoria por su paso por la mucosa hacia otros sitios del organismo. Las bacterias que invaden las células epiteliales también producen síntomas disenteriformes. Los agentes más comunes son *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva. Las bacterias penetran la capa superficial de la mucosa, y rara vez alcanzan el torrente circulatorio. Otras bacterias no solo invaden la mucosa sino que penetran los vasos sanguíneos de la submucosa y se diseminan sistémicamente. *Salmonella typhi* y *S. choleraesuis* son agentes etiológicos de fiebre entérica, cuadros sistémicos caracterizados por fiebre, cefalea, vómitos y constipación. La invasividad contribuye a la patogénesis de la enfermedad causada por otros serotipos de *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *C. fetus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda* y, posiblemente, *Clostridium difficile*.

IV. Adhesión a mucosa intestinal, alterando las funciones normales de absorción y secreción. La capacidad adherente de *Vibrio cholerae* así como de varias cepas de *E. coli* ha sido extensamente estudiada, y se han descrito factores de colonización antigénicos (CFA), expresados en adhesinas tipo fimbrias o fibrillas. La adhesión le permite a las bacterias colonizar y secretar sus toxinas cerca de las células epiteliales. Por otra parte, los cuadros diarreicos producidos por *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Microsporidium* se asocian en parte a su capacidad de adherirse al epitelio intestinal.

El ámbito completo de factores de virulencia involucrados en la producción de diarrea está representado en los distintos tipos de *E. coli*, a saber enterotoxigénica (ECET), toxina lábil (ECLT), toxina estable a (ECSTa), toxina estable b (ECSTb), enterohemorrágica (ECEH), enteroinvasiva (ECEI), enteropatógena (ECEP), localmente adherente (AL), adhesiva y despegable, enteroagregativa (ECEAg) y difusamente adherente (ECDA). Esta bacteria puede producir una o varias enterotoxinas, ser invasiva, producir colitis hemorrágica o ser adherente/agregativa, dependiendo de genes transmisibles presentes en plásmidos y bacteriófagos.

## **2. Principios del procesamiento de muestras**

Las enfermedades diarreicas son una causa mucho mayor de morbilidad y mortalidad que las enfermedades más comunes de la sociedad industrializada (cardiopatías, cáncer y accidentes cerebrovasculares), siendo los lactantes y niños pequeños los más afectados, en especial con malas medidas sanitarias y una alimentación deficiente. La diarrea infecciosa aguda es causada por un número de agentes diferentes: bacterias, virus y protozoarios. El laboratorio clínico rutinariamente busca las bacterias que más comúnmente causan diarreas, sin embargo, se requiere la colaboración del médico para asegurar la búsqueda precisa de un agente particular. Por consiguiente, se debe obtener una historia clínica completa, que incluya los síntomas del paciente, hora de iniciación, edad, historia de viajes, consumo de alimentos y tratamiento con antimicrobianos. Cada microorganismo posee mecanismos patogénicos únicos que causan una serie de síntomas, los cuales pueden ser clasificados inicialmente (Cuadro 2). Sin embargo, debe tenerse siempre presente que los microorganismos no se adhieren estrictamente a estas categorías.

**Cuadro 2. Sintomatología asociada con los mecanismos de la enfermedad diarreica**

<b>Parámetro</b>	<b>Producción de toxina</b>	<b>Invasión de tejido</b>
Consistencia de las heces	acuosa	suaves (semilíquida o pastosa)
Volumen de las heces	voluminosa	pequeño
Vómito	si	no
Fiebre	no	si
Deshidratación	si	ligera
Tiempo de inicio	pocas horas – 2 días	1-3 días
PMNs en las heces	no	si
Sangre en las heces	no	si
Moco en las heces	no	si
Sitio de infección primaria	intestino delgado	intestino grueso

**3. Selección, recolección y transporte de muestras*****Muestras aceptables.***

Los principales criterios de aceptación de muestras para cultivo incluyen:

- Hisopos rectales de niños o adultos con diarrea aguda.
- Muestras no contaminadas con orina.
- Seleccionar las porciones que contengan pus, sangre o moco.
- Heces formadas en estudios epidemiológicos.
- Recibir 2 o 3 muestras de días separados incrementa la probabilidad de aislar el patógeno.
- Muestras frescas de 1-2 horas, o preservadas como se describe mas adelante.

***Muestras inaceptables.***

Las muestras que no deben aceptarse, se rigen por los siguientes criterios:

- Muestras de más de 2 horas no preservadas
- Hisopos rectales secos
- Varias muestras en un mismo día
- Muestras sin datos del paciente, hora y procedencia.

***Recolección de la muestra.***

Para la recolección de las muestras se deben de seguir las siguientes recomendaciones:

- Frascos plásticos con tapa de rosca de cierre hermético.
- Hisopos en tubos con tapa.

***Preservación y transporte.***

Las muestras fecales que no se pueden inocular directamente en los medios de cultivo se pueden preservar a 4 – 6°C en:

- Buffer salino de glicerol (partes iguales de buffer salino de fosfatos 0.033 M pH 7.0 y glicerol) recomendado para *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., pero no para *Campylobacter* sp. y *Vibrio* sp., a menos que sea enriquecido con CaCl<sub>2</sub> (100 mg/l).

- Medio de transporte Cary-Blair, apropiado para *Vibrio* spp. y *Campylobacter* spp, pero no es tan efectivo para recuperar *Shigella* sp. y es inapropiado para *Clostridium difficile*. Algunos autores recomiendan reducir el contenido de agar de 0.5% a 0.16% para el mantenimiento de *Campylobacter* spp.

Otro tipo de muestras se puede preservar y transportar de la siguiente manera:

- Muestras para estudio por *C. difficile* se deben congelar a -20°C hasta su procesamiento.
- Hisopados rectales pueden transportarse alternativamente en un caldo Gram negativo (GN).
- Contenidos de duodeno, colostomías o ileostomías se transportan en viales.
- Biopsias rectales se transportan en contenedores estériles con agua destilada, no sumergir en formalina.

### **Medios de enriquecimiento.**

Los medios de enriquecimiento se utilizan para aumentar la probabilidad de crecimiento de ciertas especies bacterianas mientras se inhiben microorganismos no deseados. Son particularmente útiles en la recuperación de *Salmonella* de heces de portadores y de pacientes con infecciones leves por *Shigella*, donde los números pueden ser tan bajos como 200 bacterias/g de heces. El principio de trabajo de los medios de enriquecimiento es el mantenimiento en fase log de *E. coli* y otros comensales fecales debido a los inhibidores químicos del caldo (desoxicolato, selenito, tiosulfato). *Salmonella* y *Shigella* son menos inhibidas y entran en fase log más rápidamente, lo que aumenta su número. No obstante, con el tiempo la inhibición de coliformes disminuye, por lo que se recomienda subcultivar dentro de las 8 h de inoculado el caldo para evitar sobrecrecimiento.

- Caldo Gram-negativo (GN): contiene desoxicolato de sodio, citrato, manitol. Medio poco selectivo, apropiado para *Shigella* spp. y *Salmonella* spp.
- Caldo selenito F: contiene selenito de sodio. Medio altamente selectivo para *Salmonella* spp.
- Caldo tetrionato: contiene tiosulfato de sodio, sales biliares y carbonato de calcio. Debe agregarse 0.1 ml/tubo de solución yodo-yoduro antes de inocular la muestra. Medio altamente selectivo para *Salmonella* spp.
- Agua peptonada alcalina (pH 8.6): apropiado para *Vibrio cholerae*.

### **Medios de inoculación primaria.**

El microbiólogo debería examinar los especímenes de heces por *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* spp., y por predominio evidente de *Staphylococcus aureus*, levaduras y *Pseudomonas* spp. Debido al riesgo potencial del cólera, debe incluirse el protocolo de aislamiento para *Vibrio cholerae* en casos sospechosos y en las regiones de mayor incidencia. Cada laboratorio debe evaluar la historia del paciente, la población, la localización geográfica y el tamaño del hospital para determinar los medios selectivos de rutina y de aislamiento especial. El cuadro 3 resume los principales medios selectivos de inoculación primaria para coprocultivos.

**Cuadro 3.** Medios de cultivo primarios para coprocultivos e interpretación del crecimiento.

Medio	Aislamiento esperado	Morfología colonial
<b>Diferencial</b>		
MacConkey	Gram- negativos entéricos	Incoloras o rosadas
Eosina- Azul de metileno (Levine)	Gram- negativos entéricos	Incoloras o ligeramente púrpura
<b>Moderadamente selectivos</b>		
Tergitol-7	Gram-negativos entéricos	Amarillas (coliformes), azules ( <i>Salmonella-Shigella</i> )
Hektoen	Salmonella – Shigella	Azul o verde, con o sin centro negro
Xilosa- lisina-desoxicolato(XLD)	Patógenos entéricos	Rojas con o sin centro negro.
Salmonella- Shigella (SS)	<i>Salmonella- Shigella</i>	Incolora con o sin centro negro
<b>Altamente selectivos</b>		
Verde brillante (VB)	Salmonella	Rojas o rosadas
Bismuto sulfito (BS)	Salmonella	Negras, café, o verdes, con o sin brillo metálico alrededor
<b>Otros</b>		
Agar sangre (AS)	Predominio de <i>Staphylococcus</i> , levaduras y <i>Pseudomonas</i>	Según especie.
TCBS	<i>Vibrio sp.</i>	Amarillas o verdes
AS- Ampicilina	<i>Aeromonas sp.</i>	Hemolíticas
Agar- Campy	<i>Campylobacter sp.</i>	Convexas a mucoides, color gris a rosado

#### 4. Procedimientos.

##### **Examen directo.**

Un examen al fresco de una muestra de heces sin teñir es útil para detectar parásitos y, con experiencia, las formas curvas y con movilidad en dardo de *Campylobacter* y *Vibrio cholerae* a partir de heces frescas. Estos últimos se pueden observar mejor en microscopios de campo oscuro o contraste de fases.

##### 1. Examen a fresco con azul de metileno.

Seleccionar una porción de material fecal de un área con sangre y moco y mezclar con una gota del colorante de azul de metileno de Loeffler (azul de metileno al 0.3% en etanol al 30%) por 2-3 minutos observar en alto poder seco. El predominio de polimorfonucleares indica la presencia de un posible patógeno invasivo, mientras que el predominio de monocitos se asocia con infecciones por *Salmonella typhi*.

##### 2. Tinción de Gram.

Preparar un frotis delgado del material fecal y realizar una tinción de Gram. Observar predominio de polimorfonucleares, levaduras, cocos Gram-positivos o bacilos Gram-

negativos, lo cual puede sugerir una infección por *Candida*, *S. aureus* o *Pseudomonas*, respectivamente. El predominio de bacilos Gram-positivos largos, rectos y con paredes paralelas puede sugerir sobrecrecimiento de *Clostridium difficile*, aun cuando no es una prueba totalmente confiable de la infección. La tinción de Gram modificada con fucsina básica al 0.1% permite la observación de bacilos Gram-negativos delgados, en forma de coma, ese (S) o en alas de gaviota, sugestivo de infección por *Campylobacter* spp. Además, puede usarse una tinción de Giemsa para buscar protozoarios relacionados con cuadros diarreicos.

### **Cultivo primario de rutina.**

#### 1. Aislamiento de *Salmonella* sp. y *Shigella* sp.

Las muestras que se reciben para la detección de éstos patógenos deben cultivarse en un medio de enriquecimiento, un medio de soporte, un medio levemente selectivo-diferencial, y un medio moderadamente selectivo. El uso de un medio altamente selectivo no se justifica para uso de rutina, con excepción de la investigación de un brote. Los medios más comúnmente recomendados, de acuerdo con las posibilidades del laboratorio, son los siguientes:

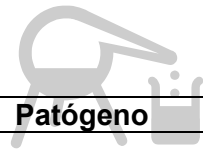
- Medio de soporte: agar sangre (agar tripticasa-soya con 5% de sangre).
- Medio diferencial: agar MacConkey o agar eosina-azul de metileno de Levine.
- Moderadamente selectivo: agar Hektoen, agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar Salmonella-Shigella (SS).
- Altamente selectivo: agar verde brillante y agar bismuto sulfito.

Con el fin de aumentar la probabilidad de aislar alguno de estos agentes se pueden utilizar los siguientes caldos:

- Caldo GN: la muestra se inocula en el caldo, se incuba a 35°C estrictamente por 4 a 6 horas y se subcultiva a medios diferenciales y selectivos.
- Caldo Selenito F y caldo tetrionato: la muestra se inocula en el caldo, se incuba a 35°C por 12 horas y se subcultiva a medios diferenciales y selectivos.

Las placas se inoculan directamente con una asada de la muestra de heces, con el hisopo rectal o del medio de transporte, o a partir de los caldos de enriquecimiento, se rayan con asa y se incuban a 35°C por 18-24 h. Las colonias que se deben buscar son lactosa negativa con o sin H<sub>2</sub>S, las cuales se inoculan por picadura y/o rayado a TSI y urea (puede inocularse además otros medios similares, como LIA y SIM). De acuerdo con la reacción bioquímica, que se muestra en el cuadro 4, se procede a la identificación bioquímica completa y serológica.



**Cuadro 4.** Diferenciación de posibles patógenos entéricos

TSI	Urea	Procedimiento	Patógeno
K/A H <sub>2</sub> S+	–	Completar identificación bioquímica y serología	<i>Salmonella</i> spp.
K/A G H <sub>2</sub> S+	–	Completar identificación bioquímica	<i>Salmonella</i> spp, <i>Edwardsiella</i> spp.
K/A G	–	Completar identificación bioquímica	<i>Salmonella</i> spp. <i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i> A, <i>Shigella</i> <i>flexneri</i> 6
K/A	–	Indol + y oxidasa+, completar identificación	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Plesiomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
	–	Indol –, completar identificación bioquímica y serología	<i>S. typhi</i>
	–	Completar identificación bioquímica y serología	<i>Shigella</i> spp.
	+	Oxidasa –, completar identificación bioquímica	<i>Yersinia</i> spp.
	–	Oxidasa+, completar identificación bioquímica	<i>Vibrio</i> spp, <i>Aeromonas</i> spp
A/A	–	Oxidasa+, completar identificación y serología	<i>Vibrío cholerae</i>
	+	Oxidasa –, completar identificación bioquímica	<i>Yersinia</i> spp.
	–	Oxidasa –, completar identificación bioquímica	<i>Yersinia</i> spp.

La identificación bioquímica completa puede realizarse mediante métodos manuales tradicionales de tubos con medios de diferenciación, métodos miniaturizados (API20E, R/B Enteric, Enterotube-II, Minitek), o automatizados (Biolog, Vitek, Pasco, Microscan Walkaway).

La clasificación taxonómica de *Salmonella* incluye 6 subgrupos:

- Subgrupo 1: incluye la mayoría de serotipos, *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. paratyphi*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*.
- Subgrupo 2: *S. salame*
- Subgrupo 3a: *S. arizonae*
- Subgrupo 3b: *S. diarizonae*
- Subgrupo 4: *S. houtenae*
- Subgrupo 5: *S. bongori*
- Subgrupo 6: *S. choleraesuis* subsp. *indica*

La identificación serológica de los aislamientos, se basa en la reacción de suspensiones de colonias sospechosas con antisueros específicos contra los antígenos somáticos (O). En *Salmonella* se considera una única especie con cinco serogrupos reconocidos y más de 2,200 serotipos. En el cuadro 5 se muestran los principales serogrupos asociados con síndromes clínicos.

**Cuadro 5.** Clasificación serológica y síndromes de *Salmonella* en humanos

Serotipo	Serogrupo O	Vi	Síndrome
<i>S. paratyphi</i>	A	–	Fiebre entérica
<i>S. paratyphi</i>	B	–	Fiebre entérica
<i>S. typhimurium</i>	B	–	Gastroenteritis
<i>S. paratyphi</i>	C <sub>1</sub>	+	Fiebre entérica
<i>S. cholera.suis</i>	C <sub>1</sub>	–	Bacteremia
<i>S. newport</i>	C	–	Gastroenteritis
<i>S. typhi</i>	D	+	Fiebre entérica
<i>S. enteritidis</i>	D	–	Gastroenteritis
<i>S. Dublín</i>	D	–	Bacteremia
<i>S. arizona</i>	No agrupable	–	Gastroenteritis

El género *Shigella* se puede clasificar en cuatro serogrupos O, los cuales corresponden a especies:

- Serogrupo A: *S. dysenteriae*
- Serogrupo B: *S. flexneri*
- Serogrupo C: *S. boydii*
- Serogrupo D: *S. sonnei*

La clasificación del CDC combina *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, y *S. boydii* (grupos A, B y C) como *Shigella*-serogrupos A, B, C, dada su similaridad bioquímica. La actividad de ornitina descarboxilasa y  $\beta$ -galactosidasa hacen a la mayoría de cepas de *S. sonnei* bioquímicamente diferentes.

## 2. Aislamiento de *Campylobacter sp.*

El aislamiento de *Campylobacter* recae sobre la selectividad del medio, la cual depende de los agentes antimicrobianos en el medio, el ambiente microaerofílico (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) y la temperatura de incubación a 42°C, los cuales suprimen el crecimiento de la mayoría de bacterias comensales. En muchos laboratorios se tiene como práctica común examinar la muestra al fresco o teñida para detectar la presencia de bacilos típicos y abundantes leucocitos. Las muestras negativas por leucocitos no son procesadas por *Campylobacter*, ya que la probabilidad de aislar esta bacteria en cantidades significativas es muy baja, y el costo de los medios y los requisitos de cultivo son muy altos.

La muestra debe cultivarse en alguno de los medios comerciales recomendados:

- Agar Blaser (Campy-AS)
- Agar Skirrow
- Agar Butzler
- Agar Preston

La atmósfera microaerofílica se puede generar utilizando una jarra y un sobre para anaerobiosis, por evacuación y reemplazo de mezcla de gases o por medio de Bio-Bags con generadores de gas. Debe hacerse una revisión de las placas a las 24, 48 y hasta 72 horas buscando las colonias sospechosas. Las colonias son pequeñas, convexas, translúcidas, grisáceas y asemejan una gota de agua.

La identificación presuntiva de las colonias incluye una tinción de Gram modificado con fucsina básica al 0.1% y la observación de las formas de "S" o en alas de gaviota. La prueba de oxidasa debe ser positiva y se puede observar la movilidad en dardo resuspendiendo el microorganismo en un caldo Mueller-Hinton y observando a 40X entre porta y cubreobjetos. Las principales pruebas bioquímicas de diferenciación se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Diferenciación de especies termofilicas de *Campylobacter*.

Organismo	Catalasa	Hipurato	Susceptibilidad a:		H2S en TSI
			Acido Nalidixico	Cefalotina	
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	+	-	R	S	-
<i>C. hydrointestinalis</i>	+	-	R	S	+
<i>C. jejuni</i>	+	+	S	R	-
<i>C. coli</i>	+	-	S	R	-
<i>C. laridis</i>	+	-	R	R	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	S	S	-

### 3. Aislamiento de *Aeromonas* spp.

*Aeromonas* spp. causa una diarrea acuosa que se ha asociado con ingestión de agua no potable. Debe descartarse *Aeromonas* spp. si la historia del paciente o los síntomas sugieren una fuente de infección de este tipo. *Aeromonas* spp. crece en los medios de rutina, pero existe un medio selectivo apropiado para su detección.

Las muestras se cultivan en:

- Agar sangre con 10 xg de ampicilina /ml(AS-AMP).
- MAC o EMB

Las placas se incuban a 35°C por 24 horas en aerobiosis. Investigar las placas por colonias con o sin hemólisis beta que no sean *Pseudomonas* y realizar prueba de oxidasa, la cual debe ser positiva. En el medio MAC o EMB se obtienen colonias lactosa negativa.

### 4. Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides*.

*Plesiomonas* spp. se ha implicado como agente de gastroenteritis en pacientes que toman aguas no tratadas y comen mariscos crudos (especialmente ostras y otros bivalvos). *Plesiomonas* crece en algunos medios diferenciales de rutina, como MAC o HE, sin embargo, se puede utilizar un medio selectivo específico para detectar este microorganismo.

Los medios de cultivo utilizados para las muestras de heces son:

- Medio selectivo: agar inositol-bilis-verde brillante. Colonias blanco-rosadas.
- MAC, IIE o XLD: colonias lactosa negativas, oxidasa positivas.
- AS para evaluar colonias oxidasa positiva diferentes de *Pseudomonas*.

## **Cultivo primario de patógenos especiales.**

### 1. Aislamiento de *Vibrio* sp.

Las muestras sospechosas por *Vibrio cholerae* se cultivan en agar TCBS y agar sangre, los cuales se incuban a 35°C por 24 horas. Para el enriquecimiento se utiliza el agua peptonada alcalina, la cual se debe incubar de 5 a 8 horas a 35°C para luego subcultivar a agar TCBS y agar sangre. Las colonias sospechosas son aquellas que presentan una coloración amarilla en el agar TCBS y una hemólisis beta en el agar sangre (cuadro 3). En el agar TCBS algunos coliformes, como *Proteus* sp. y enterococos pueden crecer. Con respecto a la manipulación, identificación presuntiva, transporte y reporte preliminar deben seguirse los lineamientos dados por el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología, del INCIENSA.

A las colonias sospechosas se les practica:

- Tinción de Gram, observando los bacilos característicos en forma de coma.
- Prueba de oxidasa del agar sangre, la cual debe ser positiva.
- Prueba de hilo mucoide: suspender colonias (obtenidas de un medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, el ADN liberado ocasionará que la mezcla se haga viscosa. Al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un “hilo” mucoide. La mayor parte de *Vibrio* spp. son positivos, en tanto que las cepas de *Aeromonas* sp. suelen ser negativas.
- Identificación serológica: el uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *Vibrio cholerae* O1 y O139. Las cepas no O1 también causan enfermedad, pero las cepas O1 están relacionadas con epidemias.
- Perfil completo de reacciones bioquímicas, en forma manual o automatizada.

## 2. Aislamiento de *Yersinia* sp.

Son bacilos Gram-negativos miembros de Enterobacteriaceae que no fermentan lactosa, crecen mejor a 25°C y son móviles a esta misma temperatura y no a 37°C. El procesamiento incluye los siguientes medios:

- Medio selectivo: agar cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN), en el cual *Yersinia* produce colonias rojo oscuro con bordes transparentes.
- Enriquecimiento en frío: inocular la muestra en buffer salino de fosfato (pH 7,6) de 4 a 5°C por 3 semanas y subcultivar a intervalos de una semana en MAC.
- Agar HE: produce colonias amarillas pequeñas.

## 3. Aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7.

En el ámbito de laboratorio es muy difícil diferenciar las variantes de *Escherichia coli*, con excepción de la mayoría de cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (ECEH). Se utiliza como medio diferencial el MAC-sorbitol, en el cual esta bacteria es incapaz de hidrolizar sorbitol y produce colonias incoloras, sorbitol-negativo. No obstante, es importante indicar que existen otras bacterias entéricas sorbitol negativo por lo que la presencia de colonias negativas al sorbitol no es diagnóstica de ECEH. Para la identificación definitiva se toman de 5 a 10 colonias y se realiza la serología con los antisueros específicos, así como la detección de Verotoxina en ensayos con cultivo celular.

Por consiguiente, el clínico debe basarse en los síntomas y la historia clínica para solicitar un estudio por un serotipo específico de *E. coli*, y someter toda muestra de heces con sangre a análisis por ECEH.

Otros agentes de enfermedad del tracto gastrointestinal.

- *Clostridium difficile*. Debe inocularse un medio selectivo (cicloserina-cefoxitina-fructosa-yema de huevo) y realizarse un ensayo para detectar las toxinas, por medio de aglutinación en látex o inmunoensayo enzimático.
- *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *S. aureus*. Las heces de pacientes con intoxicación alimentaria, así como las muestras de alimentos, cultivos de personas que manipulan alimentos y cualquier otro material potencialmente infeccioso, deben remitirse a un centro de referencia para su aislamiento e identificación.
- *E. coli* enteropatogénica, enteroinvasiva, enterotoxigénica o enteroadherente. No se disponen de medios selectivos específicos. Se pueden seleccionar cinco colonias de los medios convencionales, aislarlas y remitirlas a un laboratorio de referencia para su identificación.



## 5. Reporte de resultados

### Cultivos negativos.

- Reportar “**No se aisló *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, etc.**”, mencionando todos los microorganismos utilizados en el tamizaje.
- No reportar “**No patógenos entéricos**”, porque es muy ambiguo y puede conducir a equivocaciones.

### Cultivos Positivos.

- Si hay sobrecrecimiento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* o *Candida* spp., reportar “**predominancia o cultivo puro de (género y especie si es posible)**”
- Reportes presuntivos de *Salmonella* y *Shigella*: de acuerdo con el resultado de las pruebas bioquímicas preliminares y la reacción serológica (por ej., aglutinación positiva en un serogrupo), puede reportarse de la siguiente manera:

Resultado	Reportar
<i>Salmonella</i> sp. que aglutina en un grupo específico	<i>Salmonella</i> grupo X. Confirmación pendiente.
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i> . Confirmación pendiente.
<i>Salmonella</i> sp. que no aglutina en ningún grupo	Organismo identificado bioquímicamente como <i>Salmonella</i> . Confirmación pendiente.
<i>Shigella</i> , grupo A	<i>Shigella dysenteriae</i> . Confirmación pendiente.
<i>Shigella</i> , grupo B	<i>Shigella flexneri</i> . Confirmación pendiente.
<i>Shigella</i> , grupo C	<i>Shigella boydii</i> . Confirmación pendiente.
<i>Shigella</i> , grupo D	<i>Shigella sonnei</i>

- Repones finales: basados en los resultados finales provenientes del laboratorio de referencia después de la identificación serológica completa.
- Reportar cualquier aislamiento de *Campylobacter* spp.
- Reportar *Aeromonas* sp. o grupo A. *hydrophila*. No se recomienda la identificación de rutina de los aislamientos de *Aeromonas* hasta especies, ya que los sistemas disponibles pueden presentar dificultades al determinar las especies.
- Reportar cualquier aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* de heces.
- Reportar cualquier aislamiento de *Vibrio* spp. y de *Yersinia* spp. En el caso de *Vibrio* debe notificarse inmediatamente al Centro de Referencia.
- Reportar la presencia o ausencia de toxinas A y B (citotoxina) de *C. difficile*, de acuerdo con los resultados del inmunoensayo utilizado. El aislamiento por sí solo no es significativo dado que es parte de la flora normal
- Reportar “**Cultivo negativo por *E. coli* O157:H7.**” o por el serotipo investigado.
- La notificación inmediata al médico depende de la política del laboratorio, la organización y el sistema de comunicación (por ej., Computarizado). Los aislamientos de *V. cholerae* o *S. typhi* requieren notificación personal inmediata.
- Notificación al epidemiólogo hospitalario y al sistema de salud pública: enfermedades de reporte obligatorio
- El aislamiento de *Campylobacter* spp., *E. coli* patogénica, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. o *Yersinia* spp. debe reportarse al epidemiólogo o comité de epidemiología del hospital, así como a las autoridades responsables de salud pública, para que se tomen las medidas higiénicas preventivas correspondientes.



## 6. Cronograma de actividades.

### ***Día 1.***

- Se reciben las muestras de heces para su procesamiento.
- Se observa su consistencia y se anota
- Se siembran las siguientes placas de medios sólidos:
  - MacConkey
  - SS
  - TCBS
  - EMB-Levine
  - Hektoen

### ***Día 2***

- Realizar tinción de Gram
- Sembrar TSI
- Realizar las pruebas bioquímicas según cepa.

### ***Día 3***

- Leer pruebas e identificar la bacteria.
- Mantener en ATS.

## 7. Referencias.

1. Baron, E. J., L. R. Peterson, and S. M. Tenover. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, Ninth Edition. 1994. Mosby: St Louis. MO.
2. Grasmick, A. Processing and Interpretation of Bacterial Fecal Cultures, Section 1.10. En: Isenberg, H. D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 1. 1992. American Society for Microbiology: Washington, D.C.
3. Koneman, E. W., 5. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Tenover, and W. C. Winn. *Diagnostic Microbiology*, Fifth Edition. 1997. Lippincott: Philadelphia.
4. Murray, P. R. (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, Sixth Edition. 1995. American Society for Microbiology: Washington, D.C.

**XV****PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS****1. Consideraciones generales**

La bacteremia, situación en la cual se encuentran bacterias circulando en la sangre, puede ser indicativo de la presencia de un foco infeccioso, tal como infección intravascular, neumonía o un absceso de hígado, o puede representar la liberación transitoria de bacterias en el torrente sanguíneo. La septicemia o sepsis es indicativo de un proceso en el que las bacterias se multiplican a una tasa que excede la capacidad del sistema reticuloendotelial de removerlas, y cuya presencia en la circulación está asociada a daño al hospedero.

Las bacterias entran al torrente sanguíneo desde focos extravasculares, vía vasos linfáticos. La bacteremia puede ser transitoria, intermitente o continua, reflejando los mecanismos de entrada a la circulación. La bacteremia transitoria puede ocurrir cuando los microorganismos, a menudo de la flora normal, son introducidos a la sangre como consecuencia de procedimientos relativamente simples (cepillado de dientes, abrasiones gingivales, manipulación). La bacteremia intermitente ocurre por liberación periódica de sitios de infección, tales como abscesos extravasculares, cavidades empiémicas, o infecciones difusas (celulitis, peritonitis, artritis séptica). La bacteremia continua usualmente se produce en casos donde los organismos tienen acceso directo al torrente circulatorio, tales como endocarditis, fistulas arteriovenosas, catéteres intraarteriales o cánulas permanentes. Los sitios de entrada más comunes para la septicemia son tracto genitourinario (25%), tracto respiratorio (20%) y abscesos (10%), mientras que en un 35% de los casos no se conoce con exactitud la fuente de la bacteremia. Los bacilos Gram-negativos, en particular los miembros de la familia Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*) y *Pseudomonas aeruginosa* están presentes en más del 50% de las bacteremias. Estos microorganismos son capaces de colonizar rápida y eficazmente la piel y tracto gastrointestinal de pacientes hospitalizados, lo cual, sumado a su resistencia relativamente alta a los antimicrobianos, se convierten en un factor de riesgo importante.

Varios mecanismos juegan un papel en la remoción de microorganismos de la circulación. En hospederos sanos e inmunocompetentes, un influjo súbito de bacterias usualmente es aclarado de la sangre en 30 a 45 minutos. El hígado y el bazo actúan como órganos de eliminación primarios, y los neutrófilos intravasculares como filtros secundarios. Las bacterias encapsuladas son más difíciles de eliminar, pero la presencia de anticuerpos específicos promueve el aclaramiento. Pacientes con enfermedades debilitantes o inmunodeficientes están a un alto riesgo porque las bacterias pueden permanecer por horas antes de ser eliminadas.

La sepsis bacteriana constituye una de las más serias enfermedades infecciosas. No es una enfermedad de reporte obligatorio, y es posible que muchas muertes debidas a sepsis sean atribuidas a enfermedades subyacentes. Los signos y síntomas pueden incluir fiebre o hipotermia, hiperventilación y alcalosis respiratoria subsiguiente, lesiones en piel y alteraciones en el estado mental. Las manifestaciones más serias incluyen hipotensión o choque, coagulación intravascular diseminada y falla orgánica múltiple. La sepsis es un proceso progresivo, asociado con el daño orgánico, para lo cual se han propuesto nuevos términos y definiciones, resumidos en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Definiciones en la sepsis por Gram-negativos

<b>Término</b>	<b>Definición</b>
Infección	Fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia de microorganismos o a la invasión de tejidos normalmente estériles del hospedero.
Bacteremia	Presencia de bacterias viables en sangre.
SRIS	Respuesta inflamatoria sistémica a una variedad de daños clínicos severos. Presentes dos o más de las siguientes condiciones: temperatura >38°C o < 36°C; ritmo cardíaco, >90 latidos/min; frecuencia respiratoria, > 20 respiraciones/min, o PaCO <sub>2</sub> , < 32 mm Hg; recuento leucocitario, > 12000 células/ml, <4000 células/ml, o 10% formas inmaduras (bandas).
Sepsis	Respuesta sistémica a la infección. Presentes dos o más de las siguientes condiciones producto de la infección: temperatura, >38°C o <36°C; ritmo cardíaco, > 90 lat./min; frecuencia respiratoria, >20 resp./min, o PaCO <sub>2</sub> , < 32 mm Hg; recuento leucocitario, > 12000 células/ml, <4000 células/ml, o 10% formas inmaduras (bandas).
Síndrome séptico (sepsis severa)	Sepsis asociada con disfunción orgánica e hipoperfusión, dada por hipoxemia, oliguria, acidosis láctica, o alteración aguda del estado mental.
Choque séptico	Síndrome séptico con hipotensión
Hipotensión	Disminución sostenida de la presión sanguínea sistólica a < 90 mm Hg o reducción de > 40 mm Hg del nivel basal en ausencia de otras causas de hipotensión.
Síndrome de disfunción orgánica múltiple	Presencia de función orgánica alterada en un paciente sumamente enfermo cuya homeostasis no puede mantenerse sin intervención

Los principales factores de riesgo en el choque séptico se incluyen en el cuadro 2. Los fluidos intravenosos contaminados son otro factor de riesgo para el desarrollo de brotes bacterémicos en hospitales.



**Cuadro 2.** Factores de riesgo en sepsis

Terapia con antibióticos de amplio espectro
Tratamientos inmunosupresores: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimioterapia</li> <li>• Radioterapia</li> <li>• Agentes para reducir el rechazo de trasplantes</li> <li>• Esteroides</li> </ul>
Dispositivos o procedimientos invasivos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cirugía</li> <li>• Catéteres vasculares y vesicales</li> <li>• Tubos de drenaje</li> <li>• Equipo de terapia por inhalación</li> </ul>
Heridas penetrantes
Quemaduras o traumas
Obstrucción anatómica
Ulceración intestinal
Edad: muy jóvenes o muy viejos
Condiciones clínicas progresivas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer</li> <li>• Diabetes</li> <li>• SIDA</li> </ul>

El choque es la complicación más grave de la septicemia. En el choque séptico la presencia de productos bacterianos y los componentes defensivos del sistema inmune actúan en conjunto para provocar graves alteraciones en los principales sistemas fisiológicos del hospedero. Las bacterias Gram-negativas poseen en su pared celular el lipopolisacárido (LPS), o endotoxina, el cual ejerce un efecto potente sobre varias funciones fisiológicas. El LPS puede ser liberado durante el ciclo normal de crecimiento bacteriano o después de la destrucción de las bacterias por las defensas del hospedero.

La porción lipídica del LPS, o lípido A, es capaz de mediar una serie de reacciones sistémicas en las que participan componentes celulares del sistema inmune, tales como monocitos-macrófagos y neutrófilos, productores de citoquinas de acción inflamatoria, como factor de necrosis tumoral o interleucina-1, y componentes humorales, como el sistema de complemento y algunos factores de la coagulación. De la misma manera, las bacterias Gram-positivas, carentes de LPS, son capaces de iniciar síndromes similares, mediante la acción de toxinas de diverso origen y mecanismo de acción, así como por la liberación de componentes de pared celular, entre los que se encuentran el peptidoglicano y los ácidos lipoteicoicos. La gravedad del síndrome asociado a las bacteremias, indicado por su alta tasa de mortalidad, depende de las condiciones concomitantes. La sepsis continua siendo una emergencia médica de difícil manejo clínico, el cual se esquematiza en el cuadro 3.

Los microorganismos Gram-positivos más comúnmente aislados de sangre son los estafilococos coagulasa-negativa, *Staphylococcus aureus*, y *Enterococcus* sp., microorganismos habitantes del ambiente hospitalario y colonizadores de piel, área orofaríngea y tracto gastrointestinal de pacientes hospitalizados. Con el uso creciente de catéteres intravenosos, líneas intraarteriales y prótesis valvulares, microorganismos que pertenecen a la flora normal de piel pueden ganar acceso a superficies intravasculares y producen cuadros de endocarditis.

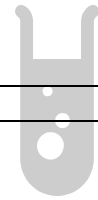
Cuando esto ocurre, colonias enteras de bacterias envueltas en fibrina (vegetaciones) se desarrollan en las válvulas cardiacas, y se liberan en forma continua al torrente circulatorio. Esto conlleva a fenómenos de diseminación metastásica con infección en múltiples órganos, embolias e infartos sépticos y circulación de complejos inmunes.

En este contexto son importantes causas de endocarditis en válvulas prostéticas *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativa, y *S. aureus*, el cual también es común en septicemias sin endocarditis.

### Cuadro 3. Manejo clínico de la sepsis

Manejo temprano: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibioticoterapia: aminoglucósido cefalosporina de espectro expandido</li> </ul>
Manejo de fluidos y electrolitos: amins simpaticomiméticas (dopamina, norepinefrina)
Esteroides: uso controversial
Inmunoterapia: en ensayos clínicos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sueros policlonales anti-LPS: J5</li> <li>• Anticuerpos monoclonales: E5, HA-IA</li> <li>• Anticuerpos contra mediadores: TNF, IL- 1</li> <li>• Antagonistas y citoquinas: IL-Ira, IL-10</li> </ul>

Los causantes primarios de endocarditis infecciosa son los estreptococos viridans, que incluyen varias especies. Estos organismos son habitantes normales de la cavidad oral o del tracto gastrointestinal, y a menudo ganan acceso al torrente circulatorio a través de gingivitis, periodontitis, o manipulaciones dentales. Las válvulas cardiacas, especialmente aquellas que han sido previamente dañadas, presentan superficies apropiadas para la adhesión de estas bacterias. Las vegetaciones resultantes provocan la diseminación hematógica de bacterias a una tasa lenta pero constante. La identificación bioquímica de los estreptococos podría tener utilidad, ya que ciertas especies, como *Streptococcus anginosus*, se han asociado con una mayor frecuencia a la formación de abscesos metastásicos. *S. sanguis* y *S. mutans* son los agentes más frecuentes de endocarditis estreptocócica. Otros microorganismos causantes de endocarditis con bacteremia asociada están incluidos en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Agentes etiológicos de endocarditis infecciosa

<b>Alta frecuencia</b>	<b>Baja frecuencia</b>
<b>Cocos Gram-positivos</b> * <u>Estreptococos</u> -Estreptococos grupo viridans: <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. mutans</i> -Enterococos: <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. Duran</i> , <i>S. bovis</i> <i>S. pneumoniae</i> -Estreptococos $\beta$ -hemolíticos: <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , estreptococos grupos C, E y G -Estreptococos nutricionalmente deficientes * <u>Estafilococos</u> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	<b>Bacilos Gram-positivos</b> <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. Subtilis</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>Listeria monocytogenes</i>  <b>Anaerobios</b> <i>Peptococcus</i> (coco Gram+) <i>Clostridium perfringens</i> (bacilo Gram+) <i>Bacteroides</i> spp. (bacilo Gram–) <i>Fusobacterium necrophorum</i>
<b>Cocos Gram-negativos</b> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. Meningitidis</i> <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	<b>Bacterias intracelulares</b> <i>Brucella</i> spp. <i>Legionella</i> spp. <i>Bartonella henselae</i> , <i>B. quintana</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>C. psittaci</i> <i>Mycobacterium</i> spp
<b>Bacilos Gram-negativos</b> Enterobacteriaceae: <i>E. Coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (drogadictos IV) <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Acinetobacter</i>	
<b>Cocobacilos Gram-negativos</b> Grupo HACEK: <i>Haemophilus</i> spp. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> <i>Kingella kingae</i>	

La detección de *Streptococcus bovis* (un estreptococo del grupo D no enterococo) en sangre, está significativamente asociado con el carcinoma de colon; además, su identificación y diferenciación de *Enterococcus* sp. es importante dada su susceptibilidad a la penicilina G, mientras que los cuadros producidos por enterococos requieren una estrategia terapéutica mucho más agresiva. La neumonía neumocócica puede a su vez cursar con bacteremia en un 20 a 30% de los pacientes, y es más confiable que el cultivo de esputo para establecer el diagnóstico. Los neumococos crecen muy bien en los medios bifásicos para hemocultivo.

El pronóstico de los pacientes con neumonía neumocócica complicada con sepsis es mucho más reservado. Las infecciones por especies de *Haemophilus* representan otro tipo de situaciones clínicas que a menudo se acompañan de complicaciones por sepsis. Los organismos anaeróbicos también causan septicemias. *Bacteroides fragilis* es el anaerobio más comúnmente aislado a partir de sangre. Sin embargo, *Clostridium perfringens* puede provocar una enfermedad fatal fulminante, por lo cual debe ser identificado presuntivamente por medio de una tinción de Gram y la presencia de hemólisis y gas en la botella de hemocultivo.



## 2. Recolección de la muestra.

### **Antisepsis de la piel y venipunción.**

Las precauciones universales requieren que los flebotomistas usen guantes durante el procedimiento.

Selección del sitio de punción.

- a) Se debe seleccionar un sitio diferente de punción en cada toma de muestra.
- b) Evitar sangrar de vía intravenosa o catéter arterial a menos que halla una sospecha de sepsis por catéter.

Venipunción.

- a) Limpiar el área de punción con alcohol 70% (isopropílico o etílico).
- b) Empezando en el centro del sitio, limpiar concéntricamente con tintura de yodo 1 a 2% por 30 seg.
- c) Dejar secar. No tocar el área antes de sangrar.
- d) Desinfectar la tapa de las botellas con alcohol o yodo y dejar secar.
- e) Insertar la aguja en la vena una sola vez y obtener la sangre. No cambiar la aguja antes de inyectar la sangre en la botella. Utilizar una nueva aguja si se falla la vena.
- f) Inocular el medio de cultivo con anticoagulante.
- g) Agregar suficiente volumen de sangre para obtener una razón de 1:10 de sangre a medio de cultivo.
- h) Mezclar bien la sangre para evitar coagulación.
- i) Después de sangrar limpiar el área con alcohol de 70% para remover el exceso de yodo lo que podría causar irritación en algunos pacientes.

### **Volumen de muestra.**

La cantidad de sangre es crítica porque la concentración de las bacterias en la sangre usualmente es baja, especialmente si el paciente está bajo tratamiento antimicrobiano. En infantes y niños la concentración de microorganismos durante la bacteremia es más alta que en adultos, por consiguiente, se requiere menos cantidad sangre para el cultivo.

Volumen recomendado

- a. Niños: 1 a 5 ml de sangre por venipunción
- b. Adultos: 10 a 30 ml de sangre por venipunción

Recolección del volumen de sangre

Infantes y niños:

- a) Obtener de 0.5 a 3 ml por botella de cultivo, dependiendo de la edad del paciente.

Adultos:

- a) obtener 10-20 ml por punción
- b) dividir en 2 botellas: ambas aeróbicas, o bien, una aeróbica y otra anaeróbica.

El uso de la botella anaeróbica es una práctica que se recomienda cuando hay sospecha clínica de infección por anaerobios. Según algunos autores, el uso de dos botellas aeróbicas mas el cultivo selectivo por anaerobios puede incrementar en un 6% el número de aislamientos clínicamente importantes.



## Número y el tiempo de la muestra de sangre

En el caso de sepsis aguda, meningitis, osteomielitis, artritis, neumonía aguda sin tratamiento o pielonefritis.:

- Obtener 2 muestras de sangre de dos sitios diferentes antes de empezar el tratamiento.

En sospecha de endocarditis y bacteremia continua de baja magnitud:

- a) Aguda: extraer 3 muestras de 3 sitios diferentes durante las primeras 1 a 2 horas de evaluación y antes de iniciar tratamiento.
- b) Subaguda: extraer 3 muestras en el día 1 (15 minutos o más de diferencia). Si todos los cultivos están negativos en el día 2, obtener 3 muestras más.
- c) Pacientes con endocarditis bajo tratamiento antimicrobiano: extraer 2 muestras separadas en cada día por 3 días sucesivos.

Pacientes con tratamiento antimicrobiano.

- a) Extraer 6 muestras durante 48 horas.
- b) Recolectar muestras inmediatamente antes de la siguiente dosis de antibiótico.

Fiebre de origen oscuro: (abscesos ocultos, fiebre tifoidea, brucelosis).

- a) Obtener 2 muestras separadas al inicio. Después de 24 a 36 horas obtener 2 más antes del aumento en la temperatura corporal.
- b) Los rendimientos positivos más allá de 4 hemocultivos son mínimos.

## Materiales

### Anticoagulante.

- a) El medio debe contener 0.025 a 0.05% polianetolsulfonato de sodio (SPS).
- b) El SPS es un anticoagulante que inhibe la actividad bactericida del suero contra muchas bacterias y la fagocitosis, inactiva el complemento y neutraliza los lisosomas y los antibióticos tipo aminoglucósidos.
- c) *Neisseria* spp. puede ser inhibida por SPS. La adición de gelatina a una concentración de 1% puede contrarrestar el efecto inhibitorio, pero el SPS es capaz de inhibir otros organismos (*Gardnerella vaginalis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Peptostreptococcus anaerobius*).

Sistemas manuales para aislamiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas.

- a) Medios líquidos: infusión cerebro-corazón (ICC), Brucella, Columbia, peptona suplementada, tripticasa-soya.
- b) Medios bifásicos:
  - Medio de Ruiz-Castañeda: fase líquida, caldo tripticasa-soya; fase sólida, agar tripticasa-soya.
  - Septi-Chek (Roche Diagnostics) con paletas recubiertas de agar.
  - Agar inclinado Becton Dickinson Vacutainer.

Ambos tipos de medios son comparables en diseño y recuperación de microorganismos. Los sistemas utilizan una botella con caldo tripticasa-soya, la cual está conectada a una segunda cámara plástica que contiene una paleta con varias superficies recubiertas de medios con agar rico o selectivo-diferenciales. El subcultivo inicial se hace a las 4 a 6 h de incubación a 35°C por inversión de la botella, de manera que el caldo inunde las superficies con agar, y se continúa la incubación. La botella puede ser invertida regularmente para reinocular. El Septi-

Chek puede aumentar la recuperación de *Streptococcus pneumoniae*, pero no la de microorganismos anaerobios.



Sistemas de lisis y centrifugación: Isolator (Wampole Laboratories).

El sistema Isolator es un tubo especial que contiene saponina, un químico que lisa tanto eritrocitos como leucocitos, propilenglicol para disminuir la formación de espuma, SPS como anticoagulante y EDTA para quelar iones de calcio y así inhibir la coagulación y el complemento. La muestra de sangre (7.5 a 10 ml) se coloca en el tubo, se mezcla por inversión y se centrifuga a 3000 r.p.m. por 15 min. para concentrar los microorganismos con la ayuda de un fluoroquímico inerte (Fluorinert, 3M). Después de la centrifugación, se aspira el sedimento y se inocula en los medios apropiados. Varios estudios han demostrado el aumento en la recuperación de ciertos microorganismos (*Legionella*, *Mycobacterium*, hongos), pero las desventajas incluyen una mayor tasa de contaminación y la necesidad de manipular el sistema en una cámara de bioseguridad de flujo laminar.

a) Medios específicos para anaerobios:

- Tioglicolato
- Tiol
- Infusión cerebro-corazón anaerobio

b) Resinas para remoción de antibióticos: sistema ARD (Marion Laboratories).

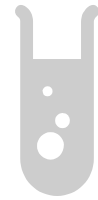
El vial contiene una resina absorbente polimérica y una resina catiónica para remover hasta 100 µg de antibiótico. La sangre debe mezclarse por rotación en el vial por 15 minutos, centrifugar para remover las resinas, y luego inocular en los medios de elección. Aún cuando los estudios no han demostrado mayores ventajas con este sistema, se han encontrado aumentos en los porcentajes de recuperación de microorganismos tales como enterobacterias, *S. pneumoniae*, *Enterococcus* y estreptococos viridans. Una desventaja es la inhibición de ciertas especies fastidiosas de bacilos y cocos Gram-negativos.

### Sistemas automatizados

La introducción al mercado de sistemas de hemocultivos de lectura continua, automatizados y computarizados representa uno de los más significativos avances en la microbiología clínica de los últimos 5 a 10 años. Los sistemas BacT/Alert (BioMérieux), BACTEC 9240/9 120 y ESP (VersaTrek), han sido aprobados por FDA para su uso en laboratorios clínicos en Estados Unidos. Los principios del funcionamiento de estos sistemas, y sus ventajas y/o desventajas comparativas con otros sistemas comerciales se resumen en el cuadro 5.

**Cuadro5.** Sistemas de hemocultivos automatizados y computarizados

Sistema	Principio	Comentarios
BacT/Alert 3D (bioMérieux)	Sensor colorimétrico de CO <sub>2</sub>	Igual o más sensibles que el BACTEC radiométrico y Isolator
BACTEC 9240/9120 (Beckton-Dickinson)	Sensor fluorimétrico de CO <sub>2</sub>	Igual o más sensibles que el BACTEC radiométrico y algunas botellas BacT/Alert y Septi-Check
ESP II (VersaTrek )	Monitoreo manométrico de producción de CO <sub>2</sub> y consumo de H <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	Más rápido que Septi-Check y detecta mayor número de bacterias que BacT/Alert



### 3. Procedimientos.

#### Consideraciones generales

Observar las precauciones universales al manejar muestras de sangre.

- Usar guantes al manejar cualquier fluido corporal.
- Si es posible hacer todo el procedimiento en cabinas de bioseguridad, o, en su defecto, utilizar una pantalla transparente para manipular la muestra.
- Descartar las jeringas, agujas y otros objetos punzantes contaminados en un recipiente especial.
- Nunca volver a tapar una aguja.

#### Sistemas manuales.

##### I. Medios convencionales.

- Colectar sangre e inocular en medio líquido con anticoagulante.
- Añadir sangre de manera que la dilución quede 1:10 de sangre por medio.
- Incubar a 35°C por 7 días.
- Optativamente, puede agitarse la botella en forma continua durante las primeras 24 horas.
- Inspeccionar las botellas visualmente por lo menos una vez al día. En el cuadro 6 se indican algunos signos de crecimiento microbiano en botellas de hemocultivo.
- Hacer tinción de Gram y subcultivos de las botellas a las 6, 18 horas y a las 48 horas y un último reporte a los 6 días, para confirmar un cultivo negativo.

#### Cuadro 6. Signos visibles de crecimiento en hemocultivos

Observación	Microorganismo asociado
Hemólisis	Cocos Gram-positivos, <i>Listeria</i> , clostridios, <i>Bacillus</i>
Turbidez	Bacilos Gram-negativos aerobios, estafilococos, <i>Bacteroides</i>
Gas	Bacilos Gram-negativos aerobios, anaerobios
Película	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , levaduras
Coágulo	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonias visibles	Estafilococos, estreptococos

Ventilación de las botellas.

- El propósito de ventilar las botellas es proporcionar una atmósfera que permita que se recupere los aeróbicos estrictos como *Pseudomonas* sp. y levaduras.
- Se ventila solo una botella cuando se envían 2 frascos. Si se utilizan medios aeróbico y anaeróbico se ventila solo el medio aeróbico.
- En una cámara de bioseguridad se inserta el dispositivo para ventilar (por ej., aguja con tapón de algodón estéril) y así se libera el vacío. Se retira y se descarta apropiadamente.

Medios para subcultivo.

- Los subcultivos iniciales deben incluir agar chocolate, agar sangre, agar MacConkey (si se observan bacterias Gram-negativas) y agar sangre suplementado para anaerobios (optativo).
- Remover asépticamente 2o3 gotas del medio bien mezclado y esparcir sobre las placas.
- La incidencia de infecciones polimicrobianas varía de 3 a 20% en los hemocultivos

positivos. Por lo tanto, se deben inocular por rayado las placas para obtener colonias aisladas.

- d) Incubar las placas de agar chocolate en 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 35°C por 48 h.



### **Reporte de hemocultivos positivos.**

Reporte verbal.

- a) Telefonar inmediatamente después de confirmar un cultivo positivo por Gram.
- b) Indicar el nombre de la persona que llamó, la fecha y hora de la llamada.
- c) Proveer el máximo de información posible: número de muestras positivas, morfología y arreglo microscópico, cultivos positivos de otros sitios anatómicos. Un reporte de cocos Gram-positivos en cadenas es más útil que uno de cocos Gram-positivos solamente. Un reporte de *E. coli* a partir de un urocultivo y un bacilo Gram-negativo en el hemocultivo pueden sugerirle al clínico la posible fuente de infección.

Reporte escrito.

- a) Proveer una copia de todos los resultados preliminares (no crecimiento o positivos por Gram).
- b) Proveer una copia de los resultados finales.
- c) Indicar la duración de la incubación en los reportes negativos: **“No crecimiento a los 7 días”**
- d) Reportar identificación y antibiograma de los cultivos positivos.

## **4. Procesamiento de hemocultivos con requerimientos especiales**

### **Brucelosis.**

*Brucella* spp. son patógenos de clase III, por lo tanto las muestras deben manejarse en una cámara de bioseguridad. En algunos casos, solamente los cultivos de médula ósea resultan positivos.

- a) Preferiblemente utilizar medios bifásicos o Isolator. Para medios líquidos, inocular caldo tripticasa- soya o *Brucella* con 5 a 10% de CO<sub>2</sub>. Incubar a 37°C.
- b) Si se utilizan medios bifásicos, ventilar las botellas como se describió anteriormente.
- c) Inspeccionar botellas cada 48 a 96 horas. Subcultivar botellas visualmente negativas y hacer subcultivos cada semana por 4 semanas.
- d) Los subcultivos deben hacerse a placas de agar sangre con base de caldo *Brucella* o infusión cerebro-corazón, e incubar con 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C por un mínimo de 3 semanas.

### **Leptospirosis.**

La leptospirosis puede diagnosticarse mediante el aislamiento de la espiroqueta de la sangre durante los primeros 4 a 7 días de enfermedad. Los medios recomendados son el medio Fletcher, Tween 80-albúmina (TA-80), o el medio semisólido Ellinghausen, McCullough, Jonson, Harris (EMHJ), a los cuales se agrega hasta 14% (vol/vol) de suero de conejo.

- a) Colocar 5 ml del medio de Fletcher y/o medio TA-80 en cada uno de 6 tubos.
- b) A 2 tubos de cada medio, añadir una gota de sangre.
- c) A 2 tubos de cada medio, añadir 2 gotas de sangre.
- d) A 2 tubos de cada medio, añadir 1 gota de sangre que ha sido diluida 1:10 en una



solución salina buferizada con fosfatos (PBS), pH 7.4.

- e) Incubar tubos en la oscuridad a 28-30°C por 6 semanas.
- f) Con microscopio de campo oscuro examinar cultivos semanalmente removiendo 1 gota del medio por debajo de la superficie (1-3 cm).



### Infecciones por micobacterias

Organismos del complejo *M. tuberculosis* y del complejo *M avium-intracellulare* a menudo pueden ser aislados de sangre de pacientes con SIDA. Al tiempo que la infección es diagnosticada, las bacterias usualmente circulan en grandes números.

#### a) Medios especiales:

- Caldo Middlebrook 7H9 con 0.05% SPS.
- Caldo infusión cerebro-corazón con Tween 80, con o sin agar inclinado Middlebrook 7H11.
- Septi-Chek bifásico.
- Isolator.

#### b) Sistemas automatizados:

- BACTEC, ESP II, BacT/Alert

El uso de métodos manuales rápidos como Septi-Chek o Isolator, junto con los sistemas automatizados, ha disminuido significativamente el tiempo de detección de cultivos positivos por micobacterias. La sangre puede permanecer en los tubos de Isolator por periodos prolongados sin disminuir la recuperación de *M. avium*, lo que facilita su transporte y procesamiento.

## 4. Cronograma de actividades.

### Día 1

- Se recolectan las muestras de sangre y se rotulan con nombre y apellidos de la persona que tomó la muestra, quien será el o la responsable exclusivo(a) de la calidad de la misma.

### Día 2

- Entrega de los hemocultivos.
- Realizar la observación macroscópica del hemocultivo.
- Subcultivar en:
  - Agar sangre
  - Agar chocolate
- Realizar la tinción de Gram.

### Día 3

- Observar la morfología colonial.
- Mantener en ATS.
- Realizar identificación hasta género y especie.

**5. Referencias.**

1. Bansal, R. C. Infective endocarditis. 1995. *Medical Clinics of North America*, 79:1205-1239.
2. Baron, E. J., L. R. Peterson, and S. M. Finegold. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, Ninth Edition. 1994. Mosby: St Louis. MO.
3. Bone, R. C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. 1993. *Clinical Microbiology Reviews*, 6:57-68.
4. Grasmick, A. Processing and Interpretation of Blood Cultures, Section 1.10. En: Isenberg, H. D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 1. 1992. American Society for Microbiology: Washington, D.C.
5. Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn. *Diagnostic Microbiology*, Fifth Edition. 1997. Lippincott: Philadelphia.
6. Murray, P. R. (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, Sixth Edition. 1995. American Society for Microbiology: Washington, D.C.



## **XVI**

### **PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS**

#### **1. Introducción**

Muchos microorganismos se pueden asociar con infecciones en la piel y tejidos subcutáneos. Este documento se referirá al aislamiento e identificación de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, las cuales constituyen la mayoría de agentes etiológicos encontrados en estas lesiones. El cuadro 1 resume algunos de los principales agentes de infecciones en piel y tejidos blandos. La búsqueda de anaerobios, levaduras, hongos, parásitos y virus deberá considerarse dependiendo de la información clínica sugerente.

En la interpretación de los resultados de cultivo es importante diferenciar los patógenos potenciales de los microorganismos comúnmente presentes como flora normal o “contaminantes”.

#### **2. Recolección y transporte de la muestra.**

##### ***Normas generales***

- En la mayoría de las infecciones, las muestras de tejido o material aspirado con jeringa y aguja son las óptimas para el aislamiento de organismos infecciosos.
- El material aspirado con aguja y jeringa es preferible al recolectado con hisopos.
- La superficie de la piel debe ser desinfectada apropiadamente antes de recolectar el espécimen, para minimizar la contaminación externa.
- Los hisopos deben ser enviados en un medio de transporte adecuado, tal como Stuart o Amies, en recipientes estériles. Los hisopos secos son inaceptables.
- El transporte de las muestras al laboratorio debe ser inmediato.
- Todas las muestras deben de estar debidamente rotuladas, con hora y fecha de recolección, así como datos demográficos del paciente.
- Deben hacerse el mayor esfuerzo en recolectar especímenes de la mejor calidad posible. Las muestras que se entregan con mucho atraso, o que contienen flora de piel contaminante generan información confusa y pérdida de valiosos recursos del laboratorio. Se debe solicitar una nueva muestra cuando se presenten muestras inapropiadas, y guardar todos los especímenes, ya que las nuevas recolecciones no siempre son posibles.

**Cuadro 1.** Lista parcial de bacterias anaerobias facultativas y aerobias causantes de infecciones en piel y tejidos blandos

Organismo	Enfermedad o síndrome
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Lesiones actinomicóticas o similares
<i>Aeromonas</i> spp.	Infección de heridas, celulitis
<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Infección de tejidos blandos
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Abscesos
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria cutánea
<i>Corynebacterium</i> grupo JK ( <i>C. jeikeium</i> )	Heridas, catéteres
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	Eritrasma
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Dermatitis
<i>Eikenella corrodens</i>	Infección de tejidos blandos, mordeduras humanas y lesiones contundentes
<i>Enterobacteriaceae</i>	Heridas, quemaduras, lesiones crónicas y profundas
<i>Enterococcus</i> spp.	Heridas, quemaduras
<i>Etysipelothrix rhusiopathiae</i>	Erisipeloide
<i>Haemophilus influenzae</i>	Lesiones cutáneas asociadas con infecciones sistémicas
<i>Kingella kingae</i>	Infecciones óseas y articulares
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis cutánea
<i>Mycobacterium marinum</i>	Lesiones cutáneas nodulares y ulcerosas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Lesiones cutáneas asociadas con infección sistémica
<i>Nocardia</i> spp.	Abscesos cutáneos y subcutáneos
<i>Pasteurella multocida</i>	Mordeduras animales, osteomielitis
Flora oral indígena	Mordeduras humanas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Heridas, quemaduras, foliculitis, forúnculos, carbunclos
<i>Pseudomonas</i> spp.	Heridas, linfadenitis supurativa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones superficiales eritematosas, infecciones profundas, foliculitis, forúnculos, carbunclos, abscesos, heridas, quemaduras
<i>Staphylococcus</i> spp., coagulasa negativa	Catéteres
<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)	Infecciones superficiales eritematosas, heridas, quemaduras
<i>Streptococcus</i> spp., beta-hemolíticos	Heridas
<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Heridas, catéteres, mordeduras
<i>Vibrio vulnificus</i>	Heridas, mionecrosis
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Mordeduras animales



### 3. Procesamiento de las muestras.

#### **Consideraciones generales.**

- a) Inocular las muestras en agar sangre, medios selectivos para aerobios Gram-negativos y Gram-positivos (por ej., MacConkey, Manitol-Sal), medios enriquecidos como agar chocolate, y un medio líquido para recuperar organismos en muy bajo número.
- b) Las muestras recibidas en hisopos se emulsifican en 0.5 ml de caldo (CTS, Brucella, etc.) y se inoculan del caldo los medios primarios y láminas para tinción de Gram.
- c) Las muestras recibidas en jeringa se inoculan directamente en los medios y láminas, tan rápido como sea posible. Asimismo, se pueden inocular medios de transporte y cultivo anaerobios.
- d) Las infecciones de tejidos subcutáneos, fascias y músculos a menudo están asociadas a sepsis, por lo que los hemocultivos son obligatorios.

#### **Tinción de Gram.**

- a) Preparar frotis de las muestras y observar el número de neutrófilos o histiocitos-macrófagos (indicadores de infección) y células epiteliales escamosas (contaminación superficial), así como las cantidades relativas de los diferentes microorganismos.
- b) Reportar los resultados inmediatamente.
- c) Determinar la necesidad para procedimientos adicionales, tales como cultivo por hongos o anaerobios, y la necesidad de medios o técnicas especiales.
- d) Antes de reportar los resultados finales del cultivo, correlacionar las observaciones de la tinción directa de Gram con el cultivo. Aislar e identificar todas las especies presentes en cantidades significativas en las muestras recolectadas y transportadas adecuadamente.

#### **Medios especiales.**

- a) La mayoría de los patógenos potenciales de piel y tejidos subcutáneos crecen satisfactoriamente en los medios de rutina. Inocular las muestras en medios enriquecidos como el agar chocolate para cultivar organismos fastidiosos por sospecha clínica.
- b) *Listeria monocytogenes* requiere enriquecimiento en frío para favorecer el aislamiento a partir de placenta y otros tejidos. Una porción del espécimen debe colocarse en un refrigerador a 40°C por 4 semanas o más, y subcultivar semanalmente en agar sangre a 35°C.
- c) Si existe sospecha clínica de infección por *Nocardia* o *Mycobacterium* spp., se deben incluir medios apropiados, tales como Lowenstein-Jensen o Middlebrook 7H9.

### 4. Evaluación de cultivos positivos.

#### **Consideraciones generales.**

- a) Examinar los cultivos por crecimiento a las 24 y 48 h.
- b) Incubar los cultivos con estudio por organismos fastidiosos por 5 días adicionales.
- c) Reportar los resultados preliminares en todos los cultivos a las 24 h, y actualizar o reportar finalmente a las 48 h.
- d) Reportar resultados finales a los 7 días o bien, cuando la identificación y el antibiograma estén listos.
- e) Mantener los medios líquidos por 7 días.



### **Interpretación de los cultivos.**

#### Día 1 ( $\leq 24$ h)

- a) Examinar todos los medios sólidos y líquidos por crecimiento.
- b) Si no hay crecimiento, reportar “No-crecimiento en día 1” o “No-crecimiento en  $< 24$  h”.
- c) Si hay crecimiento, anotar las características y cantidad de cada tipo colonial.
- d) Realizar tinción de Gram en cada colonia sospechosa.
- e) Realizar pruebas rápidas, y preparar suspensiones para paneles de identificación (manuales o automatizados), así como pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.
- f) Si hay crecimiento solo en el caldo, realizar una tinción de Gram.
- g) Reportar los resultados preliminares en todos los cultivos.
- h) Reincubar todos cultivos en progreso.

#### Día 2 (48 h).

- a) Observar todos los cultivos, y evaluarlos por crecimiento.
- b) Interpretar y anotar los resultados de los subcultivos, pruebas de identificación y de sensibilidad a antibióticos.
- c) Si hay nuevo crecimiento en los medios negativos a las 24 h, realizar las pruebas adicionales apropiadas.
- d) Reportar los resultados actualizados o finales en los cultivos positivos.
- e) Reincubar los caldos o los cultivos negativos por 3 a 5 días adicionales.
- f) Guardar las placas positivas, selladas con cinta adhesiva, a temperatura ambiente hasta completar todas las pruebas disponibles.

### **Notas adicionales.**

- Realizar solo aquellos procedimientos que produzcan la información clínicamente más relevante en el menor tiempo posible.
- Proveer guías y procedimientos de recolección al personal médico para evitar la contaminación de las muestras con flora indígena de la piel y zonas adyacentes a la lesión.
- Distinguir microorganismos normales o contaminantes de piel de los patógenos potenciales con el mínimo gasto o esfuerzo posible.
- Proceder a identificar los patógenos potenciales a partir de muestras recolectadas apropiadamente.
- A menos que sea solicitado específicamente por el clínico, los cultivos mixtos (más de tres patógenos potenciales, ninguno predominante) no deben ser procesados exhaustivamente en forma rutinaria, ya que proveen poca información clínicamente útil.
- Los especímenes en hisopos pueden contener más contaminantes de piel y colonizadores no patogénicos que aquellos aspirados con jeringa y aguja.
- El nivel del procesamiento depende de varios factores, tales como la fuente de la muestra, el método de recolección y los resultados de la tinción de Gram. Consultar con el clínico para esclarecer la necesidad de realizar una identificación definitiva cuestionable.

## **5. Recomendaciones para la identificación de patógenos probables.**

La tinción de Gram debe realizarse antes de cualquier procedimiento de identificación, de lo contrario, se puede provocar un retraso importante en el reporte de los resultados, gastos innecesarios de material, posibles identificaciones erróneas, todas con consecuencias negativas para el paciente.



1. Realizar la identificación definitiva y la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos en los siguientes casos:
  - a. cualquier cantidad de patógenos probables, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*.
  - b. patógenos potenciales con patrones de susceptibilidad impredecibles.
  - c. todos los organismos aislados de pacientes con infecciones asociadas con catéteres y a partir de sitios normalmente estériles.
2. Realizar solamente identificación limitada pero no prueba de susceptibilidad a antimicrobianos en los siguientes casos:
  - a. probables “contaminantes” de piel, los cuales incluyen estafilococos coagulasa-negativa, difteroides, estreptococos viridans y *Bacillus* spp., acompañados de muchas células epiteliales escamosas y/o pocos o sin leucocitos polimorfonucleares en el frotis original.
  - b. se deben identificar estos microorganismos si provienen de fuentes significativas como puntas de catéter, o bien, si son aislados en cultivo puro y correlacionan con la tinción de Gram de la muestra.
3. No realizar identificación ni antibiograma en los siguientes casos:
  - a. mas de tres especies de flora intestinal a partir de sitios tales como absceso intraabdominal, fluido peritoneal, área pélvica, úlcera de decúbito, absceso o fistula perianal y drenaje intestinal. En estos casos se debe realizar una descripción morfológica de las especies presentes.
  - b. en caso de predominar un microorganismo, debe realizarse solamente antibiograma.

## 6. Cronograma de actividades.

### Día 1

- Entrega de muestras de secreciones.
- Subcultivar en:
  - Agar sangre
  - Agar chocolate
  - Agar MacConkey
- Realizar la tinción de Gram.

### Día 2

- Realizar la descripción colonial.
- Realizar la tinción de Gram de colonias.
- Realizar caracterización bioquímica según corresponda al grupo bacteriano.

### Día 3

- Mantener en ATS.
- Realizar identificación hasta género y especie.

## 7. Referencias.

1. Forbes, B. A., D. F. Sahm, and A. 5. Weissfeld. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Tenth Edition. 1998. Mosby: St Louis. MO.
2. Koneman, E. W., 5. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn. Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. 1997. Lippincott: Philadelphia.



3. Mandell, U., R. G. Douglas, Jr., and Bennett, J. E., editors. Principles and practice of infectious diseases, 5<sup>th</sup> edition, 1997. Churchill Livingstone, New York.
4. Murray, P. R. (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Sixth Edition. 1995. American Society for Microbiology: Washington, D.C.
5. Processing of skin and subcutaneous-tissue specimens, Section 1.16. En: Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1. 1992. American Society for Microbiology: Washington, D.C.





## APENDICE A

### MEDIOS DE CULTIVO

<b>Agar almidón</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de carne	3.0
	Peptona	5.0
	Cloruro de sodio	8.0
	Almidón soluble	2.0
	Agar	15.0

<b>Agar base GC (N. gonorrhoeae)</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona proteosa N <sup>o</sup> 3 (Difco)	15.0
	Fosfato de potasio monobásico	1.0
	Almidón de maíz	1.0
	Cloruro de sodio	5.0
	Fosfato de potasio dibásico	4.0
	Agar	10.0
	pH: 7.2	

<b>Base para Agar Sangre</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Infusión de corazón de buey	500.0
	Triptosa	10.0
	Cloruro de sodio	5.0
	Agar	15.0

Después de autoclaver el medio, se debe enfriar a 45-50 °C, se agrega sangre desfibrinada de conejo, humana, ovina o bovina (para la prueba de CAMP) a concentración final del 5-10% y mezclar. Se pueden usar otras bases como agar tripticasa saya, agar infusión cerebro corazón, agar Columbia (para *Campylobacter* y *Helicobacter*), agar Brucella, etc.

<b>Agar Bismuto-Sulfito</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Glucosa	5.0
	Fosfato de Sodio	4.0
	Lab-Lemco powder	5.0
	Peptona	5.0
	Sulfato ferroso	0.3
	Verde brillante	0.016
	Indicador bismuto sulfito	8.0
	Agar	12.7
	pH: 7.6 ± 0.2	



<b>Agar Citrato de Simmons</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Fosfato de amonio	1.0
	NaCl	5.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
	Citrato de sodio	2.0
	Sulfato de magnesio	0.2
	Azul de bromotimol	0.08
	Agar	15.0
	pH 6.9	

<b>Agar Chocolate</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/500ml</b>
	Medio base GC	36.0

Después de autoclavar el medio se debe enfriar a 45-50 °C y se agrega 500 ml de una solución de hemoglobina al 2% y 10 ml de una solución de suplementos V y X (100x).

<b>Agar EMB de Levine</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
	Peptona	10.0
	Lactosa	10.0
	Azul de metileno	0.065
	Eosina Y	0.4
	Agar	15.0
	pH: 7.1	

<b>Agar F</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Digerido pancreático de caseína	10.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5
	Glicerol	10.0
	Peptona	10.0
	Agar	15.0
	pH:	7.0

<b>Agar Fenilalanina</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de levaduras	3.0
	DL-Fenilalanina	2.0
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
	Agar	12.0
	pH: 7.3	



<b>Agar Hektoen</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Proteasa peptona	12.0
	Extracto de levadura	3.0
	Lactosa	12.0
	Sacarosa	12.0
	Salicina	2.0
	Sales biliares	9.0
	NaCl	5.0
	Tiosulfato de Sodio	5.0
	Citrato férrico de amonio	1.5
	Fucsina ácida	0.1
	Azul de bromotimol	0.065
	Agar	14.0
	pH: 7.5 ±0.2	

<b>Agar Lowenstein-Jensen</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/1600ml</b>
	Asparagina	3.6
	Fosfato monopotásico	2.4
	Sulfato de magnesio	0.24
	Citrato de magnesio	0.6
	Harina de papa	30.0
	Verde de malaquita	0.4

Se disuelven los ingredientes en 588 ml de agua destilada, se agrega 12 ml de glicerol, se calienta hasta ebullición y se autoclava. Se enfría a 45-50°C y se añade 1 litro de una suspensión uniforme de huevos frescos homogenizados preparados bajo condiciones asépticas. Se mezcla sin formar burbujas, se dispensa en tubos estériles con tapa de rosca y se deja solidificar en posición inclinada.

<b>Agar MacConkey</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona (Gelysate, Bacto peptona)	17.0
	Peptona (Polypeptone)	3.0
	Lactosa	10.0
	Mezcla de sales biliares	1.5
	NaCl	5.0
	Rojo neutro	0.030
	Cristal violeta	0.001
	Agar	13.5
	pH: 7.1	

<b>Agar Movilidad</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de carne	3.0
	Peptona	10.0
	NaCl	5.0
	Agar	4.0
	pH: 7.3	



<b>Agar OF</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Trypticasa	2.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
	NaCl	5.0
	Azul de bromotimol	0.02
	Agar	3.0
	pH: 7.1	

<b>Agar P (para <i>Pseudomonas</i>)</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona	20.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.4
	Glicerol	10.0
	Agar	15.0
	pH: 7.0 ± 0.2	

<b>Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de carne res	5.0
	Peptona	5.0
	Lactosa	10.0
	Mezcla de sales biliares	8.5
	Citrato de sodio	8.5
	Tiosulfato de sodio	8.5
	Citrato férrico	1.0
	Rojo neutro	0.025
	Verde brillante	0.330
	Agar	13.5
	pH: 7.0	

<b>Agar Tergitol -7</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona	10.0
	Extracto de carne	5.0
	Extracto de levadura	6.0
	Lactosa	20.0
	Tergitol-7	0.1
	Azul de bromotimol	0.05
	Agar	13.0
	pH: 7.2 ± 0.2	


**Agar Tiosulfato Citrato Bilis  
Sacarosa (TCBS)**
**Ingredientes**
**g/litro**

Extracto de levadura	5.0
Peptona proteosa	10.0
Citrato de sodio	10.0
Tiosulfato de sodio	10.0
Bilis	8.0
Sacarosa	20.0
NaCl	10.0
Citrato férrico	1.0
Azul de bromotiinol	0.04
Azul de timol	0.04
Agar	15.0
pH: 8.6	

**Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)**
**Ingredientes**
**g/litro**

Peptona o polipeptona	20.0
Extracto de carne	3.0
Extracto de levaduras	3.0
Glucosa	1.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Sulfato ferroso	0.2
NaCl	5.0
Tiosulfato de sodio	0.3
Rojo de fenol	0.024
Agar	13.0
pH:7.3	

**Agar Trypticasa-Soya (ATS)**
**Ingredientes**
**g/litro**

Peptona (Trypticasa)	15.0
Peptona (Phytone)	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH: 7.3	

**Agar Urea de Christensen**
**Ingredientes**
**g/litro**

Peptona	1.0
Glucosa	1.0
NaCl	5.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
Urea	20.0
Rojo fenol	0.012
Agar	15.0
pH:6.8	



<b>Caldo Base de Moeller</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona	5.0
	Extracto de carne	5.0
	Púrpura de bromocresol	0.01
	Piridoxal	0.005
	Rojo de cresol	0.005
	Glucosa	0.5
	pH: 6.0	

<b>Base Caldo Púrpura de Bromocresol</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de carne	1.0
	Peptona	10.0
	Cloruro de sodio	5.0
	Púrpura de bromocresol	0.015
	pH: 6.8	

<b>Caldo Malonato</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de levaduras	1.0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
	NaCl	2.0
	Malonato de sodio	3.0
	Glucosa	0.25
	Azul de bromotimol	0.025
	pH: 6.7	

<b>Caldo MR-VP</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona	7.0
	Glucosa	5.0
	Fosfato dipotásico	5.0
	pH: 6.9	

<b>Caldo Nitratos</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Extracto de carne	3.0
	Peptona	5.0
	Nitrato de potasio	1.0
	pH: 7.0	

<b>Caldo Triptona</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>g/litro</b>
	Peptona	20.0
	NaCl	5.0
	pH: 7.0	

**Gelatina Nutritiva**

**Ingredientes**

Peptona  
Extracto de carne de res  
Gelatina  
pH: 6.8

**g/litro**  
5.0  
3.0  
120.0

