

Libros de **Cátedra**

Bacteriología en medicina veterinaria

Guía para el diagnóstico de infecciones bacterianas en pequeños animales

María Fernanda Gomez - Fabiana Alicia Moredo
Florencia Vinocur (coordinadoras)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

BACTERIOLOGÍA EN MEDICINA VETERINARIA

GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES BACTERIANAS EN PEQUEÑOS ANIMALES

María Fernanda Gomez
Fabiana Alicia Moredo
Florencia Vinocur
(coordinadoras)

Eliana Andrea Lorenti
(fotografías)

Facultad de Ciencias Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Índice

Introducción	5
PRIMERA PARTE. Generalidades	
CAPÍTULO 1.....	7
Bioseguridad en el laboratorio de bacteriología	
Eleatrice María de las Mercedes Gatti	
CAPÍTULO 2.....	23
Eventos de notificación obligatoria	
María Fernanda Gomez	
CAPÍTULO 3.....	32
Toma de muestras: generalidades	
María Fernanda Gómez	
CAPÍTULO 4.....	39
Observación y tinciones	
Camila Aurnague y Raúl Emilio Iza	
CAPÍTULO 5.....	54
Cultivo y aislamiento bacteriano	
Hernán Darío Nievas y Eliana Andrea Lorenti	
CAPÍTULO 6.....	72
Caracterización bioquímica y fisiológica de las bacterias	
Eliana Andrea Lorenti y Hernán Darío Nievas	
SEGUNDA PARTE. Procesamiento de muestras clínicas - Bacteriología General	
CAPÍTULO 7.....	89
Coprocultivo	
Fabiana Alicia Moredo	
CAPÍTULO 8.....	103
Infecciones bacterianas de piel	
Raúl Emilio Iza, Camila Aurnague, Hernán Darío Nievas y Eliana Andrea Lorenti	
CAPÍTULO 9.....	112
Urocultivo	
María Laura Meneses	
TERCERA PARTE. Procesamiento de muestras clínicas - Bacteriología Especial	
CAPÍTULO 10.....	127
Leptospirosis	
Paula Lorena Martín	
CAPÍTULO 11.....	137
Micobacteriosis	
Pedro Sebastián Sosa, Fiorella Alvarado Pinedo y Gabriel Eduardo Travería	

CAPÍTULO 12.....	147
Hemobacterias	
Paula Lorena Martín y Florencia Vinocur	
CAPÍTULO 13.....	152
Clamidiosis	
Javier Aníbal Origlia	
CUARTA PARTE. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	
CAPÍTULO 14.....	159
Antibiograma	
Fabiana Alicia Moredo	
Autores	172

Introducción

La bacteriología clínica se ocupa de los procesos infecciosos causados por agentes bacterianos, estudia sus características morfológicas, fisiológicas, los métodos de identificación y su relación con los hospedadores y con los antimicrobianos utilizados para su tratamiento.

En el trabajo diario en el laboratorio de bacteriología veterinaria estos conceptos se integran con la práctica, la cual requiere además el conocimiento de los métodos utilizados para el acondicionamiento, procesamiento y seguimiento de las muestras clínicas, las normas de bioseguridad, la disposición de notificación de enfermedades de denuncia obligatoria y de los controles de calidad. Es fundamental conocer el proceso que recorre una muestra clínica desde su toma inicial en el paciente hasta llegar al diagnóstico, etapas preanalítica, analítica y posanalítica.

La edición de este libro de cátedra surgió ante la necesidad de cubrir la dificultad que encontramos los docentes respecto a la disponibilidad de bibliografía accesible para el estudio de la bacteriología práctica veterinaria, que brinde información en relación al proceder ante las muestras destinadas al laboratorio de bacteriología y de la demanda de los estudiantes que cursan las carreras Medicina Veterinaria y Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, que en reiteradas oportunidades solicitan bibliografía sobre los contenidos prácticos de los cursos que abordan esta rama de la profesión. Cabe destacar que entre los alcances del título de Médico Veterinario se encuentra, "Realizar, interpretar y certificar análisis microbiológicos y técnicas de laboratorio destinadas al diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades de los animales; certificar las condiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial de los alimentos y de los establecimientos destinados a la elaboración, procesamiento, transformación, conservación y expendio de alimentos" y entre los del Microbiólogo, se encuentra "Realizar estudios microbiológicos y preparación de antígenos, sueros y vacunas, autovacunas y demás productos relacionados con la actividad microbiana empleados en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento en Medicina Humana y Animal".

Este libro ofrece material que permite guiar al profesional en el procesamiento de muestras de interés clínico, haciendo énfasis en los procedimientos a seguir de acuerdo a cada caso particular para lograr el aislamiento e identificación de las posibles bacterias involucradas, su interpretación e informe de los resultados.

El contenido está acotado a las muestras clínicas de caninos y felinos que con mayor frecuencia se reciben en el Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

PRIMERA PARTE

Generalidades

CAPÍTULO 1

Bioseguridad en el laboratorio de bacteriología

Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Los laboratorios de bacteriología constituyen un ambiente de trabajo donde pueden presentarse riesgos de diversos orígenes. Las normas de seguridad biológica pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo inherente a la manipulación del material peligroso, siendo muy rigurosas para los agentes más peligrosos y menos exigentes para los que causan problemas de menor entidad.

En un mundo donde los avances científicos y tecnológicos amplían constantemente las posibilidades, garantizar la seguridad en el manejo de agentes y materiales potencialmente peligrosos es fundamental. Este compromiso con la protección de las personas, el entorno y los materiales dio lugar al desarrollo de medidas específicas y rigurosas que conforman el concepto de bioseguridad.

La bioseguridad es el conjunto de medidas preventivas, probadamente eficaces y reconocidas internacionalmente, orientadas a proteger la salud y la seguridad del personal y su entorno. Estas incluyen normas para mitigar los riesgos producidos por agentes biológicos (como microorganismos patógenos), físicos, químicos y mecánicos, así como acciones de seguridad requeridas para evitar los riesgos derivados del manejo de organismos modificados genéticamente y sus derivados. Sus principios fundamentales son:

- **Prevención de accidentes:** Minimizar riesgos físicos, químicos, biológicos y radiológicos.
- **Contención:** Uso adecuado de equipos y procedimientos para evitar la exposición a agentes peligrosos.
- **Responsabilidad individual:** Capacitación del personal para seguir los protocolos de seguridad establecidos.

Las medidas generales esenciales incluyen:

- **Uso de equipo de protección personal (EPP):** Guantes, gafas de seguridad, batas de laboratorio, mascarillas, entre otros.
- **Higiene:** Lavado frecuente de manos y desinfección de áreas de trabajo.
- **Manipulación de materiales peligrosos:** Cumplir estrictamente los protocolos para cada sustancia.
- **Gestión de desechos:** Clasificar y desechar residuos correctamente, siguiendo las normativas vigentes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) es pionera en la difusión de información sobre bioseguridad. En 1983 publicó la primera edición del "Manual de bioseguridad en el laboratorio", con el objetivo de proporcionar información y motivar a los países a desarrollar sus propios códigos de seguridad. En 2023, la OMS lanzó la cuarta edición del manual, que incluye actualizaciones significativas en temas como la preparación ante brotes epidémicos, la gestión de riesgos asociados al transporte de materiales infecciosos y el manejo de organismos modificados genéticamente.

Es importante señalar que la profesión de Médico Veterinario enfrenta una alta probabilidad de accidentes laborales que incluyen:

- Enfermedades zoonóticas.
- Lesiones traumáticas en el trabajo con animales.
- Riesgos químicos en laboratorios y quirófanos.
- Riesgos físicos derivados de equipos de radiaciones ionizantes.

La mayoría de estos incidentes son resultado del uso inadecuado de los elementos de protección y el incumplimiento de medidas de bioseguridad.

Riesgo biológico y niveles de bioseguridad

El trabajo en los laboratorios clínicos y microbiológicos ya sea en el ámbito veterinario o humano, enfrenta constantes desafíos debido a su naturaleza dinámica y cambiante. Es esencial que estos espacios estén preparados para adaptarse a las crecientes exigencias de la salud pública, como lo demuestran las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. Para ello, se requieren procedimientos y prácticas de bioseguridad bien definidas. Solo a través del conocimiento y la aplicación de estas normas, el personal de laboratorio puede garantizar su propia seguridad, la de sus compañeros y la de la comunidad en general. Asimismo, los directivos tienen la responsabilidad de proporcionar las facilidades necesarias para la implementación efectiva de estas medidas.

Aunque el riesgo cero no es una realidad alcanzable, la adaptación del trabajo a niveles de seguridad apropiados es esencial. La evaluación de riesgos juega un papel crítico: sin identificar riesgos específicos, no es posible formular pasos para mitigarlos, lo que podría derivar en consecuencias adversas y costos elevados de remediación.

Las instalaciones de los laboratorios se clasifican en cuatro niveles de bioseguridad, correspondientes a los grupos de riesgo de los agentes biológicos que se manipulan:

Laboratorio Básico - Nivel 1 de Bioseguridad

Laboratorio Básico - Nivel 2 de Bioseguridad

Laboratorio de Contención - Nivel 3 de Bioseguridad

Laboratorio de Contención Máxima - Nivel 4 de Bioseguridad

Esta clasificación considera aspectos como el diseño y construcción del laboratorio, los elementos de contención, los equipos y los procedimientos requeridos para trabajar con

agentes biológicos según su grupo de riesgo. En la normativa española, el término “nivel de bioseguridad” se equipara a “nivel de contención” e incluye medidas específicas de contención para los niveles 2, 3 y 4.

Los materiales enviados al laboratorio para su estudio son potencialmente peligrosos y pueden transmitir diversos patógenos. Su manipulación responsable es esencial para evitar la contaminación del entorno, tanto dentro como fuera del laboratorio. Esto incluye la correcta eliminación de muestras procesadas, considerando que prácticas inadecuadas, como el vertido en sistemas cloacales sin tratamiento, pueden incrementar la contaminación ambiental.

Niveles de bioseguridad en el laboratorio

Los niveles de bioseguridad, que reflejan el grupo de riesgo de los microorganismos manejados, están clasificados en cuatro categorías:

- Nivel 1: Laboratorios básicos con riesgos mínimos.
- Nivel 2: Laboratorios básicos que manipulan agentes asociados a riesgos moderados.
- Nivel 3: Laboratorios de contención para trabajar con agentes que pueden causar enfermedades graves.
- Nivel 4: Laboratorios de máxima contención para microorganismos altamente peligrosos y sin tratamiento disponible.

Cada nivel está determinado por características del diseño y construcción del laboratorio, elementos de contención, equipamiento y procedimientos operativos. Además, es esencial garantizar la correcta eliminación de muestras procesadas y materiales contaminados, para evitar su impacto ambiental. La esterilización mediante autoclave y otras técnicas son cruciales para minimizar riesgos.

Los laboratorios que manipulan materiales con incertidumbre sobre la presencia de agentes biológicos capaces de causar enfermedades deben operar, como mínimo, bajo un nivel 2 de bioseguridad. Los niveles 3 y 4 deben adoptarse cuando se sepa o sospeche su necesidad, salvo indicaciones específicas de las autoridades sanitarias que requieran un nivel inferior.

Niveles de contención en el laboratorio

En los laboratorios se implementan recursos y métodos que garantizan la seguridad, reduciendo o eliminando la exposición a materiales potencialmente peligrosos. Estos niveles de contención están diseñados para proteger al operador, las personas del entorno y el medioambiente, y se clasifican en **niveles de contención primarios y niveles de contención secundarios**.

- El nivel de contención primario se enfoca en la protección directa del personal y del medio ambiente inmediato y requiere operadores capacitados en **Buenas Prácticas**

de Laboratorio (BPL) y Buenas Técnicas Microbiológicas (BTM), familiarizados con el uso adecuado de equipos y dispositivos. Además, los operadores deben ser evaluados regularmente en sus condiciones de salud y contar con vestimenta adaptada a las actividades específicas que desarrollen.

- El nivel de contención secundario involucra la combinación de las características arquitectónicas del laboratorio y las prácticas operativas implementadas. Este nivel está diseñado para contener los riesgos más complejos y se ajusta según la naturaleza de los agentes biológicos o materiales con los que se trabaja, garantizando un enfoque integral en la seguridad.

En la Tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de la relación entre los grupos de riesgo, los niveles de bioseguridad requeridos, la práctica de trabajo y el equipamiento de seguridad.

Tabla 1.1

Relación entre grupos de riesgo y niveles de bioseguridad, prácticas y equipos de trabajo

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipos de bioseguridad
1	Básico	Enseñanza, investigación	BPL, BTM	Ninguno en especial, trabajo en banco abierto
2	Básico	SSP, diagnóstico, investigación	BPL, BTM, EPI y señalización de "Biopeligroso"	Trabajo en banco abierto más CSB para control de aerosoles
3	Contención	Diagnóstico e investigación	Ídem Nivel 2 más: accesos y ventilación controlados	CSB y otros dispositivos para todas las actividades
4	Contención máxima	Patógenos peligrosos	Nivel 3 más: esclusas de aire y tratamiento específico de residuos	CSB clase III o trajes con presión positiva combinados con CSB clase II, autoclaves de doble puerta, filtración del aire

Nota. BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio. BTM: Buenas Técnicas Microbiológicas. SSP: Servicio de Salud Primario. EPI: Equipos de Protección Individual. CSB: Cabina de Seguridad Biológica.

El personal de laboratorio

La preparación y capacitación del personal en los laboratorios clínicos y de microbiología es crucial para garantizar resultados confiables y mantener altos estándares de seguridad. Los trabajadores deben estar plenamente conscientes de la importancia de aplicar las BPL y las

BTM, no solo para lograr la calidad en sus ensayos, sino también para proteger su propia seguridad y la de quienes los rodean.

La capacitación debe incluir el conocimiento de normas de conducta en el laboratorio, protocolos operativos, y la organización del trabajo, permitiendo que el personal sepa a quién acudir en caso de dificultades. Aunque se cuente con tecnología avanzada, los resultados finales siempre dependerán de la preparación, competencia y motivación del personal para operar equipos, realizar ensayos y preparar materiales, como medios de cultivo. Los nuevos integrantes deben ser entrenados rigurosamente y solo podrán desempeñar sus funciones sin supervisión una vez demostrada su capacidad.

En la Tabla 1.2 se mencionan algunas indicaciones sobre prácticas básicas para laboratorios de microbiología según normas internacionales.

Tabla 1.2

Prácticas básicas para laboratorios de microbiología

Requisitos	Medidas
Evitar el contacto con material peligroso con la piel y la boca	En el laboratorio: no mantener comida ni bebidas; no fumar; no aplicar cosméticos. Utilizar dispositivos para pipetear (no pipetear con la boca). Evitar el uso de jeringas y material cortantes. Colocar cuidadosamente en contenedor apropiado el material de vidrio a descartar (rotura).
Evitar la salida de material peligroso de las áreas de laboratorio	Lavar las manos antes de comenzar el trabajo, a la salida del laboratorio y después de tocar los materiales. Usar ropa de protección que no sale del laboratorio. Decontaminar todo el material que sale del laboratorio. Utilizar contenedores diseñados para traslado de material. Establecer un plan contra vectores.
Evitar accidentes con equipos	Cubrir los cabellos largos. Usar ropa de protección. No usar joyas durante el trabajo. Permitir solo el uso por personal capacitado.
Evitar la introducción de material contaminado ajeno al laboratorio	Prohibir la permanencia en el laboratorio de cualquier cosa no relacionada con los ensayos.
Disminuir los riesgos en accidentes	Establecer el plan ante accidentes, algunas medidas son: Informar inmediatamente al supervisor, desinfectar el área de derrame con el material infeccioso.

Es esencial implementar un sistema de vigilancia de la salud del personal, respetando la confidencialidad y dignidad de cada trabajador. Este monitoreo debe ser realizado por profesionales competentes en medicina del trabajo, apoyados por otros especialistas del área sanitaria dentro de servicios de prevención y redes epidemiológicas. Según el nivel de riesgo,

debe ofrecerse vacunación específica a trabajadores no inmunes a los agentes biológicos a los que están expuestos.

Ciertos agentes infecciosos pueden tener efectos más graves en personas embarazadas o en el feto, por lo que el personal debe estar al tanto de los riesgos y las medidas necesarias para minimizar su impacto en estos casos.

Equipo de protección individual

Los equipos de protección individual (EPI) o personal (EPP) son dispositivos diseñados para minimizar los riesgos que afectan la salud y seguridad en el trabajo, ofreciendo protección sin comprometer el confort del trabajador. Su uso es esencial para prevenir infecciones y garantizar seguridad en el manejo de materiales, equipos y fluidos biológicos contaminados, como sangre, orina y otros. Para que los EPI sean eficaces, es necesario conocer a fondo la naturaleza de los riesgos y su interacción con el entorno laboral.

El personal debe estar capacitado para utilizar el tipo adecuado de EPI, ya sea de un solo uso o reutilizable, evaluando la durabilidad y la eficacia de cada equipo. Decisiones como desechar o reutilizar dispositivos de protección deben tomarse considerando el riesgo de exposición y la posible degradación del equipo. Es obligatorio que todos los EPI estén certificados según las normativas vigentes y acompañados por instrucciones claras del fabricante.

Entre los EPI que se emplean en laboratorios biológicos y de biotecnología se destacan:

- **Protección corporal y la vestimenta adecuada:** son esenciales en entornos laborales con riesgos biológicos o químicos. El personal de laboratorio debe utilizar ropa diseñada específicamente para su actividad, evitando el uso de prendas de calle que aumenten la superficie expuesta, como pantalones cortos o sandalias. Las batas, guardapolvos o delantales ajustados a la espalda con puños elásticos son ideales para minimizar el riesgo de contacto con materiales contaminados. En áreas de alto riesgo, se pueden emplear trajes protectores integrales tipo Tyvec, algunos con ventilación positiva. Los delantales de caucho ofrecen una barrera adicional contra salpicaduras de sangre o fluidos corporales bajo presión. La ropa laboral debe ser cómoda, ligera y segura, generalmente hecha de poliéster o algodón. También existen prendas desechables de un solo uso, orientadas a actividades específicas. Todo equipo de protección debe estar claramente marcado con información como talla, fabricante, modelo y normativa vigente.
- **Protección de manos:** es fundamental para prevenir riesgos mecánicos, térmicos, químicos, eléctricos y biológicos. Los guantes de seguridad se clasifican en tres categorías:
 - Categoría 1: Protegen contra riesgos leves.
 - Categoría 2: Reducen riesgos moderados que no impliquen peligro grave.

- Categoría 3: Ofrecen protección contra riesgos graves, como lesiones críticas o muerte.

Entre los guantes más utilizados en laboratorios se encuentran:

- Guantes térmicos diseñados para trabajar con temperaturas extremas.
- Guantes de látex (naturales o sintéticos), ideales por su ajuste y sensibilidad al tacto.
- Manoplas, que son adecuadas para tareas específicas como la manipulación de ropa sucia o utensilios contaminados.

Es importante seleccionar guantes de la talla adecuada para mayor comodidad y reemplazarlos en caso de desgaste, deformación o pérdida de integridad. Además, el lavado de manos después de retirar los guantes es obligatorio para garantizar la seguridad.

- **Protección ocular:** es obligatoria para prevenir lesiones causadas por riesgos mecánicos (impactos, polvo), químicos (salpicaduras), radiaciones (ultravioleta e infrarrojo), térmicos (líquidos calientes) y eléctricos. Este equipo incluye gafas de protección, tanto de montura universal como integral, así como pantallas faciales. En el laboratorio, son comunes las antiparras y gafas con protección lateral para procesar muestras de riesgo o lavar materiales. Es esencial que los equipos sean cómodos, bien ventilados y, en caso necesario, compatibles con lentes correctoras.
- **Protección respiratoria:** protegen las vías aéreas contra contaminantes externos como polvo, vapores tóxicos y microorganismos. Es crucial seleccionar el equipo adecuado según los contaminantes presentes y garantizar que no afecte la visión, cause irritaciones o dificulte la respiración. Las mascarillas desechables (barbijos), plegables con filtro o con válvulas, son ampliamente utilizadas en laboratorios biológicos básicos. En casos de mayor riesgo, se recomienda el uso de mascarillas tipo HEPA, con alta eficacia para partículas pequeñas. Estos equipos deben ser empleados por tiempos limitados y descartados al final de la jornada laboral.

El uso correcto de los EPI nunca sustituye las buenas prácticas de trabajo, junto con su mantenimiento y evaluación periódica, asegura la protección efectiva y previene riesgos laborales. Equipos inapropiados pueden generar riesgos adicionales, al generar una falsa sensación de seguridad. Por ello, todos los EPI deben estar homologados según las normativas vigentes y acompañados de información clara sobre su uso y mantenimiento. Su implementación es un pilar en la seguridad de los entornos laborales y biotecnológicos.

Técnicas de laboratorio estándar y normas de higiene

Las técnicas de laboratorio estándar se fundamentan en el cumplimiento riguroso de las BPL y la correcta aplicación de las técnicas específicas. Como parte esencial de estas prácticas, cada laboratorio debe contar con procedimientos escritos estandarizados que detallen los pasos necesarios para minimizar los riesgos biológicos, químicos y físicos, garantizando así un entorno seguro para los trabajadores y las actividades realizadas.

Normas de higiene personal

El lavado de manos debe realizarse tanto al iniciar como al finalizar la jornada laboral, así como después de ejecutar cualquier procedimiento que implique contacto con material infeccioso. Este lavado se realiza con agua y jabón líquido, aunque ciertas situaciones específicas pueden requerir el uso de sustancias antimicrobianas. El secado debe efectuarse utilizando toallas de papel desechables o corrientes de aire.

Figura 1.1

Pasos para ponerse el equipo de protección personal



Nota. Reproducido de *Equipo de protección personal* de la Organización Panamericana de la Salud, 2015, Pasos para ponerse el equipo de protección personal (EPP), incluida la bata.

Está estrictamente prohibido comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos, guardar o almacenar alimentos o bebidas en las áreas de trabajo del laboratorio.

La práctica de pipetear con la boca queda absolutamente excluida por razones de bioseguridad.

Buenas prácticas de laboratorio

Las siguientes medidas, junto con procedimientos estandarizados, constituyen la base para operar en un entorno controlado y seguro, minimizando riesgos potenciales:

- Es importante evitar cortes, abrasiones u otras lesiones en las manos que puedan facilitar la penetración de agentes biológicos. En estos casos, es obligatorio el uso de guantes durante todas las tareas.
- Utilizar técnicas adecuadas y materiales de calidad para minimizar la contaminación de las manos.
- Lavarse las manos con agua y jabón inmediatamente después de cualquier accidente de contaminación con sangre y al finalizar el trabajo, incluso si se han utilizado guantes durante la tarea.
- Usar ropa adecuada para el entorno de trabajo. Las manchas de sangre se identifican rápidamente sobre prendas de colores claros, como blanco o verde.
- No reencapuchar agujas ni desacoplarlas de las jeringas. Ambas deben ser colocadas en un recipiente rígido y resistente a perforaciones.
- Sellar correctamente los recipientes que contienen muestras. Si están manchados de sangre, deben limpiarse con desinfectantes adecuados, como una solución de hipoclorito al 0,1 % de cloro libre (1 g/L, 1000 ppm) o productos detergentes.
- Ante pinchazos o cortes, lavar cuidadosamente la herida con agua y jabón, favoreciendo la hemorragia para eliminar posibles contaminantes.
- Cualquier contaminación de las manos u otra parte del cuerpo con sangre, así como todo pinchazo o corte, debe ser reportado al responsable de seguridad e higiene y al servicio médico.
- En trabajos de investigación que utilicen material de vidrio, es preferible emplear jeringas con ajuste tipo bayoneta para evitar que la aguja se desacople, o bien, utilizar jeringas con agujas integradas.

Otras técnicas correctas en el laboratorio son:

- Utilizar el mechero como barrera de protección entre el operador y la muestra.
- Sumergir el asa metálica cargada con material infeccioso en un frasco con arena y alcohol al 70° antes de esterilizarla en fuego directo. El alcohol debe cubrir la arena en al menos 2 cm.
- Llenar cuidadosamente las jeringas para evitar la formación de burbujas y espuma en el material a inyectar.
- Evitar, siempre que sea posible, el uso de jeringas para mezclar líquidos infecciosos.
- Al extraer líquidos de viales con presión distinta a la atmosférica, envolver la aguja y el tapón del recipiente con algodón empapado en desinfectante antes de retirar la aguja del tapón de caucho.

- Expulsar el exceso de líquido y las burbujas de la jeringa manteniéndola en posición vertical, sobre algodón empapado en desinfectante o dentro de un recipiente pequeño con algodón estéril.
- Operar las centrifugas con precaución para evitar roturas y la generación de aerosoles contaminantes.
- Utilizar cabinas de seguridad biológica cuando lo indiquen los niveles de peligrosidad del trabajo.
- Manipular adecuadamente a los animales para minimizar riesgos.

Es fundamental, en el marco de las BPL, definir los conceptos de **esterilización** y **desinfección**.

La **esterilización** implica la eliminación o remoción completa de todos los microorganismos vivos. Para lograrlo, se emplean métodos físicos como el calor, la filtración por membranas y las radiaciones.

Por otro lado, la **desinfección** busca eliminar la capacidad infecciosa de un material determinado mediante agentes químicos, aunque no necesariamente logre esterilidad. Estos agentes químicos, debido a su acción inespecífica, afectan tanto a los microorganismos como a las células de los tejidos. Por ello, su concentración y composición limitan su uso en ciertos sustratos. Se denomina **antisépticos** a los agentes químicos bacteriostáticos o bactericidas diseñados para ser aplicados sobre tejidos vivos, ya que, en concentraciones adecuadas, causan poco daño tisular. Los agentes utilizados exclusivamente sobre objetos inanimados reciben el nombre de desinfectantes. Es importante mencionar que algunos agentes químicos pueden actuar como antisépticos o desinfectantes dependiendo de su composición y aplicación; sin embargo, en algunos casos pueden ser corrosivos, irritantes o tóxicos, lo que los hace inadecuados para uso en piel o tejidos.

La **eficacia de los desinfectantes** disminuye en presencia de materia orgánica, por lo que es crucial limpiar previamente el instrumental antes de desinfectarlo. Las instrucciones para la desinfección deben redactarse considerando los microorganismos manipulados, especificando los desinfectantes a emplear y sus diluciones. Dado que las fórmulas comerciales de los productos desinfectantes pueden variar ampliamente, se deben seguir siempre las indicaciones del fabricante.

Cuando se requiere desinfección a temperatura ambiente, se emplean productos químicos para tratar instrumentos y superficies que no toleran calor seco o altas temperaturas. El desinfectante ideal debe poseer un amplio espectro de actividad, acción rápida e irreversible, estabilidad frente a agentes físicos y no deteriorar los objetos desinfectados. Además, no debe tener olores molestos ni umbrales olfativos bajos.

Todos los materiales reutilizables deben descontaminarse antes de ser lavados y esterilizados. Como desinfectante rutinario, se sugiere el uso de lavandina (solución 1:10 de blanqueador doméstico recién preparada, con 1.000 a 10.000 ppm de cloro disponible) o

amoníaco. Los contenedores de vidrio, por su parte, pueden desinfectarse con ácido fénico al 5 %, dejándolo actuar durante 24 horas antes de proceder a su limpieza con detergente y agua.

Es crucial adoptar medidas de protección y prevención para el uso de desinfectantes, atendiendo a su toxicidad inherente por su acción antimicrobiana. Se debe cumplir con las instrucciones de aplicación detalladas en las etiquetas y fichas de seguridad, y etiquetar los productos según la normativa correspondiente.

En la Tabla 1.3 se presenta un listado detallado de productos químicos desinfectantes comúnmente empleados, destacando sus características y aplicaciones específicas.

Tabla 1.3

Listado de productos químicos desinfectantes

Tipo	Concentración (%)	Acción	Mecanismo	Ventajas	Inconvenientes	Efecto sobre el humano
Alcoholes (etanol, isopropanol)	60 - 90	Bactericida, fungicida y viricida	Desnaturaliza proteínas	No mancha ni irrita	Inactivado por materia orgánica. Inflamable	
Compuesto de amonio cuaternario	0,4 - 1,6	Bactericida, fungicida y viricida	Incrementa la permeabilidad celular	Económico	No actúa sobre gramnegativas. Puede inactivar materia orgánica	Irritante Tóxico
Compuestos fenólicos	0,4 - 0,5	Bactericida, fungicida, viricida y tuberculocida	Desnaturaliza proteínas	Económico	Tóxico, corrosivo.	Irritante Tóxico Corrosivo
Iodóforos	75 pp	Bactericida, fungicida, viricida y tuberculocida	Iodación y oxidación de proteínas	Estable, con acción residual	Caro. Inactivado por materia orgánica	Irritante de piel y mucosas
Glutaraldehído	2,0	Bactericida, fungicida, viricida y tuberculocida	Alteración de proteínas	No corrosivo. ni afectado por otros compuestos	Vapores irritantes	Tóxico, irritante
Hipoclorito	500 ppm cloro libre	Bactericida, fungicida, viricida y tuberculocida	Inactivación enzimática	Económico	Tóxico, corrosivo. Inactivado por materia orgánica	Tóxico corrosivo.
Peróxido de hidrógeno	3,0	Bactericida, fungicida, viricida y tuberculocida	Radicales libres	Estable	Corrosivo y caro	

La gestión de residuos es una parte integral de la seguridad en los laboratorios. Los desechos generados pueden estar contaminados con microorganismos o contener sustancias

químicas tóxicas. Además de cumplir con la normativa vigente sobre residuos biosanitarios, se recomienda contar con sistemas internos, como autoclaves, para tratar los residuos generados. Los residuos biocontaminados y especiales deben ser transportados en recipientes impermeables y resistentes a ácidos y álcalis, con cierre hermético y capacidad máxima de 60 litros. El almacenamiento intermedio no debe exceder las 24 horas tras llenar y cerrar el recipiente.

Etiquetas y pictogramas de los productos químicos

El etiquetado reglamentario de las sustancias químicas y sus mezclas constituye una herramienta esencial para comunicar de manera eficaz y uniforme los riesgos asociados a su uso, conforme a los estándares establecidos en el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), adoptados oficialmente en Argentina por la Resolución SRT N° 801/15. En caso de transvasar un producto a otro envase, la etiqueta original debe reproducirse de forma sistemática. Las etiquetas incluyen pictogramas de peligro, palabras de advertencia, frases de peligro y consejos de prudencia, que permiten identificar el producto de forma inmediata, reducir el riesgo de confusiones y accidentes durante su manipulación y proporcionar pautas claras de actuación en caso de emergencia.

Es imprescindible almacenar los productos químicos de forma adecuada, asegurando la separación de sustancias que puedan emitir vapores o sublimarse, para evitar la contaminación cruzada y el deterioro de las etiquetas. Además, es fundamental mantener un inventario actualizado y un control riguroso de los reactivos.

Según las normativas internacionales, toda solución reactiva preparada en el laboratorio debe contar con una etiqueta conforme a las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y las normas ISO/IEC 17025.

Para garantizar la durabilidad de la etiqueta, se recomienda utilizar material impermeable transparente que la proteja de daños, y colocarla en una posición opuesta al lado donde se vierta la solución. Esto asegura una identificación clara y una manipulación segura.

Independientemente del etiquetado, se debe mantener un registro detallado de la preparación de las soluciones, garantizando su trazabilidad que incluya datos como: código del lote de agua utilizada, cantidad total de solución preparada, origen y cantidad de cada reactivo empleado, descripción simplificada del procedimiento seguido, cálculos realizados, referencias bibliográficas, fechas de preparación y vencimiento, así como las firmas del analista y del supervisor. En la Figura 1.2 se detallan los datos que debe incluir la etiqueta.

Por otro lado, los riesgos asociados a la exposición crónica, al contacto directo y a la reactividad de las sustancias químicas en un laboratorio son críticos para la seguridad del personal. Por ello, para el manejo y el almacenamiento seguros de estos productos, se utilizan métodos de codificación por colores. Este sistema permite agrupar productos del mismo color

según su clase y, al mismo tiempo, separar aquellos que presenten incompatibilidades específicas dentro de una misma categoría.

Figura 1.2

Modelo de etiqueta de una solución reactiva



Nota. 1: Identificación del fabricante/proveedor/distribuidor. 2: Frases de peligro (Las leyendas son obligatorias. El código HXXX, no). 3: Pictogramas. 4: Consejos de prudencia. 5: Palabras de advertencia. 6: Nombre del producto químico. Reproducido de *Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA)*, Superintendencia de Riesgos del Trabajo, 2015.

Los pictogramas son representaciones gráficas diseñadas para transmitir información de manera rápida y efectiva. La Figura 1.3 presenta pictogramas de peligro y ejemplos de sus respectivas clases.

Figura 1.3

Pictogramas de peligro



Nota. Reproducido de *Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA)*, Superintendencia de Riesgos del Trabajo, 2015.

Las instalaciones y condiciones ambientales

El diseño y la construcción de un laboratorio, conocidos en seguridad biológica como contención o barrera secundaria, son fundamentales para garantizar la protección del personal

del laboratorio, de las personas fuera del laboratorio y de la comunidad en general ante posibles fugas accidentales de agentes infecciosos.

Es esencial implementar una separación eficaz entre áreas vecinas que realicen actividades incompatibles, junto con medidas para prevenir la contaminación cruzada, como el control de acceso y el diseño adecuado de las instalaciones.

El acceso debe estar restringido al personal autorizado y capacitado en el manejo de agentes infecciosos. En ningún caso deben ingresar familiares ni amigos. Para el nivel 2 de contención, basta con que la puerta del laboratorio pueda cerrarse con acceso limitado, mientras que el nivel 3 requiere una puerta doble y un cambio de ropa antes de ingresar.

Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, se recomienda diseñar el laboratorio con un flujo recto de operaciones, evitando caminos de regreso. Cuando esto no sea posible, deben adoptarse alternativas como la realización secuencial de los procedimientos o la separación de actividades en tiempo o espacio.

Las áreas del laboratorio deben estar separadas o designadas claramente para actividades específicas: recepción y almacenamiento de muestras, preparación de muestras, áreas analíticas diferenciadas de las áreas de apoyo, y áreas de apoyo como preparación de medios de cultivo, esterilización, descontaminación, almacenamiento y lavado de material. Aunque el área de lavado puede compartirse con otras partes del laboratorio tras la descontaminación, deben tomarse precauciones para evitar la transferencia de sustancias que afecten el crecimiento microbiano. La separación física dependerá de parámetros específicos del laboratorio como el tipo y número de ensayos realizados.

El orden y la limpieza son cruciales. Para los laboratorios de microbiología, es imprescindible establecer procedimientos documentados de limpieza y desinfección, considerando los riesgos de contaminación y facilitando estas operaciones. Las medidas recomendadas incluyen:

- Unión cóncava entre suelo, paredes y techos.
- Iluminación empotrada en techos.
- Ventilación adecuada (natural, forzada o sistemas de aire acondicionado con filtros).
- Espacio suficiente para almacenamiento.
- Evitar tuberías sobre las superficies de trabajo sin sellado adecuado.
- Eliminar cortinas y persianas internas, salvo que estén incluidas en el programa de limpieza.
- Uso de materiales lisos, no absorbentes, fáciles de limpiar y desinfectar en paredes, techos y superficies de trabajo.

Se debe establecer un programa documentado de limpieza y desinfección basado en la vigilancia ambiental y en los posibles riesgos de contaminación cruzada. Cuando sea necesario, deben ajustarse las medidas según los resultados de esta vigilancia, como la limpieza a fondo, el incremento de la frecuencia, el cambio de procedimientos o de desinfectantes.

Las instalaciones deben contar con equipos ventilados para su manejo por personal capacitado. Las campanas de gases y las cabinas de flujo laminar ofrecen protección en

diferentes ámbitos: químico y material interno, respectivamente, pero no protegen al operador frente a riesgos biológicos.

Cabinas de seguridad biológicas

Las **cabinas de seguridad biológica (CSB) o gabinetes de seguridad** son equipos diseñados para proporcionar una barrera de contención que permite trabajar de manera segura con agentes infecciosos. Según su diseño y clasificación, estas cabinas protegen al trabajador, al medio ambiente y/o al producto. Funcionan mediante una combinación de elementos electromecánicos y procesos físicos que impulsan el aire a través de filtros HEPA (del inglés *High Efficiency Particulate Air*) de gran superficie, con una eficiencia mínima de retención de partículas del 99,99 % para tamaños de 0,3 µm.

De acuerdo con la clasificación oficial de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), las CSB se dividen en tres clases principales:

- **Clase I:** Ofrecen protección al operador y al medio ambiente, pero no garantizan la esterilidad del producto. Son adecuadas para manipular agentes biológicos de bajo o moderado riesgo.
- **Clase II:** Además de proteger al operador y al medio ambiente, garantizan la esterilidad del material dentro de la cabina. Estas se subdividen en tipos A y B, dependiendo de la proporción de aire recirculado y expulsado.
- **Clase III:** Proporcionan el nivel más alto de protección, ya que están completamente selladas y operan con guantes integrados. Son ideales para trabajar con agentes de alto riesgo biológico.

Cada clase está diseñada para cumplir con requisitos específicos de seguridad y funcionalidad, dependiendo del nivel de riesgo y las necesidades del laboratorio.

Bioseguridad en la certificación y acreditación de los laboratorios

El concepto de BPL, surgido en la industria farmacéutica en los años 60, evolucionó para abarcar laboratorios clínicos, veterinarios, de alimentos y más, impulsando la confiabilidad de los resultados y la seguridad de los productos. La acreditación, esencial para generar confianza externa, requiere cumplir no solo con las BPL, sino también con normativas internacionales, como la **ISO/IEC 17025**, que establece estándares de gestión y competencia técnica, y la **ISO 9001:2015/Amd 1:2024**, que introduce aspectos relevantes como el cambio climático.

La certificación, por su parte, valida que los productos, procesos o sistemas cumplen con especificaciones, mientras que la acreditación asegura la competencia de las organizaciones evaluadoras de conformidad, como los laboratorios. Adaptaciones específicas en áreas como microbiología o química son posibles gracias al Anexo B de la norma ISO/IEC 17025.

La implementación de estas medidas no solo asegura la calidad y seguridad, sino que optimiza recursos y fortalece la competitividad de los laboratorios en un entorno global en constante evolución.

Referencias

- Center for Disease Control and Prevention. (2019). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. https://www.cdc.gov/labs/pdf/SF_19_308133-A_BMBL6_00-BOOK-WEB-final-3.pdf
- International Organization for Standardization. (2017). ISO/IEC 17025: *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (3rd ed.). ISO.
- International Organization for Standardization. (2024). ISO 9001:2015/Amd 1:2024: *Sistemas de gestión de la calidad — Requisitos — Modificación 1: Acciones relativas al cambio climático*. ISO.
- Organización Panamericana de la Salud. (2002). *Cabinas de seguridad biológica*. <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2009/CabinasdeSeguridadBiologica.pdf>
- Organización Mundial de la Salud & Organización Panamericana de la Salud. (2015). *Pasos para ponerse el equipo de protección personal (EPP), incluida la bata*. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/153536>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Manual de bioseguridad en el laboratorio, cuarta edición*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/365600/9789240059306-spa.pdf>
- Superintendencia de Riesgos del Trabajo. (2015). *Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA)*. https://www.srt.gob.ar/wp-content/uploads/2014/03/images_pdf_SGA.pdf

CAPÍTULO 2

Eventos de notificación obligatoria

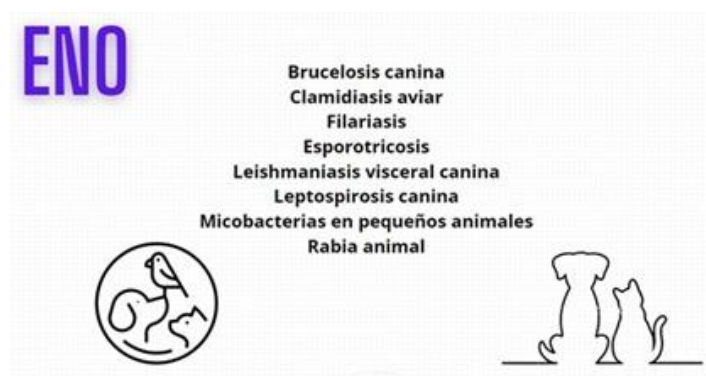
María Fernanda Gomez

Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria

Desde el año 2016, la provincia de Buenos Aires cuenta con la implementación de la Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria (NNEDO), dirigida a la vigilancia de enfermedades en pequeños animales. En ella se establece un marco regulatorio que incluye los eventos de notificación obligatoria (ENO) de enfermedades transmisibles y vectoriales (zoonóticas), como la brucelosis canina, la clamidiosis aviar, la filariasis, la esporotricosis, la leishmaniasis visceral canina, la leptospirosis canina, las infecciones por micobacterias en animales pequeños y la rabia animal.

Figura 2.1

Eventos de notificación obligatoria en pequeños animales



Nota. Adaptado de *Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en Pequeños Animales*, 2020, Departamento de zoonosis urbana, Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires.

El principal propósito de esta normativa es garantizar la existencia de un procedimiento claro y normalizado que permita a los médicos veterinarios, tanto del ámbito público como del

privado, cumplir con la obligación de notificar estas enfermedades de manera eficiente y ordenada.

Mediante un sistema de notificación específico y detallado, se busca fortalecer la vigilancia epidemiológica y optimizar las estrategias de prevención y control de enfermedades zoonóticas, contribuyendo así a la salud pública.

La NNEDO fue elaborada conjuntamente por el Departamento de Zoonosis Urbanas del Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires, el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Este trabajo colaborativo destaca la importancia de la articulación entre organismos gubernamentales, instituciones académicas y entidades profesionales para abordar las problemáticas de salud pública relacionadas con los pequeños animales.

Normativa de ENO: el pilar de la vigilancia epidemiológica

Para la notificación de las ENO, cada país tiene sus propias regulaciones, y es importante que los veterinarios y los laboratorios de diagnóstico las conozcan. Los laboratorios juegan un papel fundamental en la detección de casos y en la recopilación de datos epidemiológicos para la vigilancia de brotes y la implementación de medidas. La notificación temprana y precisa de las ENO es clave para el monitoreo de la circulación de enfermedades en la población y debe realizarse ante las autoridades veterinarias o de salud pública inmediatamente después de la confirmación del diagnóstico.

Sistema Nacional de Vigilancia

El SINAVE utiliza un sistema informático denominado “Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud” (SNVS, en su versión 2.0) y divide a los integrantes del Sistema de Salud en diferentes niveles, cada uno con responsabilidades específicas para lograr una vigilancia eficiente. A continuación, se describe en Veterinaria:

Nivel Local

Comprende a los profesionales de la salud que están en contacto directo con la población atendida (animales de cualquier especie), que en nuestro medio son los veterinarios, médicos veterinarios o laboratorios veterinarios privados, estatales y de las facultades, quienes actúan como disparadores de la vigilancia ante un diagnóstico confirmado de un ENO, poniendo en marcha los mecanismos de notificación, observación continua, monitoreo, alerta, alarma y control. Para la vigilancia de los ENO de importancia en veterinaria se utilizan diferentes estrategias; incluso, para un mismo evento, se puede seleccionar más de una.

Figura 2.2

Niveles del Sistema de Salud en Argentina

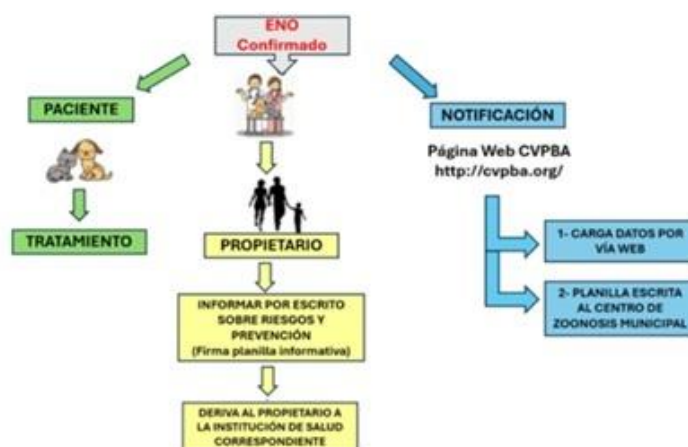


Nota. Con autorización del médico veterinario Gustavo Martínez, A/C de la División Acciones Comunitarias para la Salud, Ministerio de Salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

- **La vigilancia en consultorio veterinario**, ante un caso confirmado (por medio de métodos complementarios en laboratorio), el profesional actuante informa el ENO de forma inmediata, existiendo dos alternativas disponibles para tal fin:
 - **En línea:** los datos se cargan en un formulario cuyo enlace se encuentra disponible en la página del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires. Denuncia Obligatoria de Enfermedades Zoonóticas → <http://cvpba.org/>
En este caso, los resultados de la carga son recibidos por el Nivel Central Provincial, como, Zoonosis Urbanas del Ministerio de Salud y el Laboratorio y Zoonosis del Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires, que remitirá los datos del evento cargado al Centros de Zoonosis que corresponda.
 - **Por medio de planillas de notificación impresas**, que deben remitirse al Centro de Zoonosis Municipal correspondiente.
Al finalizar sugiere que se deben dar recomendaciones detalladas por escrito sobre las medidas preventivas a tomar. (Ver planillas anexas en la Normativa).
- **Por otro lado, está la vigilancia de laboratorios** tanto privados como los de referencia, que funcionan como “nodo” de carga. Cuando se confirma el diagnóstico por alguno de los métodos complementarios aprobados, carga el ENO en el SNVS 2.0 (Módulo SISA – Sistema integrado de Información Sanitaria Argentino).

Figura 2.3

Diagrama de flujo de las acciones que debe realizar el veterinario ante el diagnóstico confirmado de un ENO



Nota. Adaptado de *Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en Pequeños Animales*, 2022, Departamento de zoonosis urbana, Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires.

Nivel Intermedio Municipal

El nivel intermedio municipal comprende a los Centros de Zoonosis de los Municipios de la provincia de Buenos Aires. En este nivel se consolida la información remitida por el nivel local y se identifican hechos sobre el estado de salud de las poblaciones animales, con la finalidad de intervenir precozmente para la promoción, prevención y control de focos con la finalidad de limitar el impacto en la Salud Pública.

Remite la información recibida en forma periódica y oportuna al Nivel Central Provincial.

Nivel Central Provincial

El nivel central provincial, está comprendido por las Divisiones Zoonosis Urbanas y Rurales de la Dirección Epidemiológica del Ministerio de Salud y la Dirección Provincial de Carnes del Ministerio de Agroindustria (ex Asuntos Agrarios), de la provincia de Buenos Aires.

Este nivel consolida la información recibida y la registra en el SNVS 2.0, teniendo una intervención de tipo individual y poblacional, para la toma de medidas eficaces de control, prevención y promoción de la salud, como así también para la elaboración de estrategias de comunicación social, divulgación de boletines epidemiológicos a nivel provincial y asesoramiento en la formulación de normas para el control de enfermedades zoonóticas.

Nivel Central Nacional

El nivel central nacional, se encuentra dentro de la estructura del Ministerio de Salud de la Nación con el nombre de Dirección de Epidemiología. El nivel central tiene una intervención de tipo poblacional y normativa. Realiza análisis e investigaciones para la adopción de medidas de control, elabora estrategias de comunicación social, remite la información a Organismos Internacionales, elabora y divulga boletines epidemiológicos nacionales, informes y otros instrumentos para garantizar la retroalimentación del sistema.

Procedimientos diagnósticos para enfermedades bacterianas de denuncia obligatoria en pequeños animales

Historia y signos clínicos

El diagnóstico comienza con la evaluación de signos clínicos por el médico veterinario, que pueden incluir fiebre, letargo, vómitos, diarrea, dificultades respiratorias y neurológicas. También es importante registrar el historial de viajes, el contacto con otros animales o exposición a fuentes potenciales de infección.

Muestras para el diagnóstico de laboratorio

Para realizar el diagnóstico de laboratorio, es fundamental obtener muestras adecuadas del animal problema, las cuales dependerán del posible agente etiológico involucrado (Figura 2.4).

Brucelosis canina

Definición de caso

- **Sospechoso:** Todo canino hembra con afecciones del tracto reproductivo de probable origen infeccioso como: endometritis, vaginitis, piometra, abortos tardíos, nacimiento de cachorros muertos o débiles, muerte perinatal; o todo canino macho que presente: orquitis, epidermitis, prostatitis y dermatitis escrotal, del mismo origen. Para ambos sexos, la presencia de discoespondilitis, artritis, signos de enfermedad infecciosa sistémica como fiebre prolongada, uveítis, adenomegalia generalizada, y/o con nexo epidemiológico preexistente.

- **Probable:** Canino positivo al diagnóstico serológico de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), o evidenciarse la presencia de seroconversión en la aglutinación en portaobjetos (RSAT).
- **Confirmado:** Aquellos animales de ambos sexos, en los que se aísle *Brucella canis* a partir de muestras de sangre, orina, secreciones, material de aborto u otros órganos. Como así también, la detección de ADN de *Brucella* spp. mediante la técnica de PCR.

Tabla 2.1

Tipo de muestra y métodos diagnóstico de los ENO de origen bacteriano

Enfermedad	Agente etiológico	Tipo de muestra	Método diagnóstico
Brucelosis canina	<i>Brucella canis</i>	Hisopado de secreciones vaginales, membranas fetales y material de necropsia Sangre Suero	PCR/Aislamiento IDGA/RSAT/IC
Clamidiosis aviar	<i>Chlamydia psittaci</i>	Hisopado conjuntival Hisopado cloacal	Citología/IFD/ ELISA PCR
Leptospirosis canina	<i>Leptospira</i> spp.	Suero	MAT, Aglutinación macro con AgTR
Micobacteriosis	<i>Mycobacterium bovis</i>	Orina/material necropsia Lavado bronquial, punciones	Aislamiento/PCR
	<i>M. avium</i>	Hisopado rectal	Aislamiento/Baciloscopia/PCR
	<i>M. leprae</i>	Punción de granuloma	Baciloscopia/PCR

Nota. IDGA: inmunodifusión en gel de agar. RSAT: seroconversión en la aglutinación en portaobjeto.

IC: inmunocromatografía. IFD: inmunofluorescencia directa. MAT: microaglutinación. Adaptado de *Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en Pequeños Animales*, 2020, Departamento de zoonosis urbana, Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires.

Clamidiosis aviar

Definición de caso

- **Sospechoso:** Cualquier ave psitácida o no psitácida con o sin signos compatibles con la enfermedad que está epidemiológicamente relacionado con un caso humano o animal confirmado.
- **Probable:** Todo caso sospechoso con resultado positivo por citología, detección de antígeno de *Chlamydia* spp. identificado por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunofluorescencia directa (IFD) en las heces, hisopado cloacal, hisopado del tracto respiratorio, hisopado conjuntival y/o exudados oculares.
- **Confirmado**

- Todo caso probable con 2 pruebas positivas (IFD, ELISA, inmunocromatografía (IC), más nexos epidemiológico.
- Caso sospechoso o probable, con confirmación mediante pruebas diagnósticas (PCR) y/o aislamiento.

Leptospirosis canina

Definición de caso

- **Sospechoso:** Paciente con signología y epidemiología compatible con leptospirosis. Los antecedentes epidemiológicos sugestivos son: exposición a inundaciones, temporada de lluvias, barro, basurales o contacto con aguas estancadas (pozos, arroyos, lagos o ríos) y/o contacto con animales enfermos o roedores.
- **Probable:** Caso sospechoso sumado a un resultado reactivo para la prueba de referencia: prueba de Microaglutinación (MAT) con un título menor a 400 en una única muestra, ya sea a uno o más serogrupos, sin antecedentes de vacunación vigente.
- **Confirmado:** Caso sospechoso o probable sumado a:
 - En una única muestra: Prueba de MAT (microaglutinación) positiva con un título mayor o igual a 800 frente a uno o más serogrupos, sin antecedentes de haber recibido vacuna antileptospirósica en los últimos 6 meses. Aislamiento bacteriano en cultivo, realizado en medios especiales (EMJH), o por inoculación intraperitoneal en hámster, a partir de muestras de sangre, orina o material de necropsia, realizado inmediatamente a la toma de muestra y teniendo en cuenta que el resultado puede ser negativo si estos pacientes tomaron antibiótico o la muestra no fue conservada y transportada adecuadamente. Detección de ADN de *Leptospira* spp por medio de PCR de sangre, orina, y material de necropsia; su ventaja refiere a que no necesita que las bacterias sean viables, pero tiene como desventaja que no pueden diferenciarse los diferentes serogrupos, detectando solo una secuencia del genoma, que es compatible con *Leptospira* spp patógenas.
 - Seroconversión a la MAT: produciendo la 1^{ra} muestra negativa y la 2^{da} positiva o 1^{ra} y 2^{da} muestra positivas con diferencias de al menos 2 títulos entre ellas. Ambas muestras se toman con un intervalo de 15 días entre cada una.

Micobacteriosis en pequeños animales

Definición de caso

- **Sospechoso:** Se define como felino sospechoso de tuberculosis a todo aquel animal que se presente al examen clínico con uno o más antecedentes o signos compatibles con la enfermedad.
- **Compatible:** Paciente sospechoso clínico con baciloscopia AAR positiva y cultivo negativo o no realizado.

- **Tuberculoso:** Se define como felino tuberculoso al animal sospechoso clínico con aislamiento positivo de *Mycobacterium* spp.
- **Tuberculoso zoonótico:** Se define como felino tuberculoso zoonótico al animal sospechoso clínico con aislamiento de *Mycobacterium bovis*.
- **Felino no tuberculoso:** Se define como felino no tuberculoso al animal sospechoso clínico con baciloscopia AAR y cultivo negativo luego de 2 (dos) muestras.

Interpretación de resultados

La confirmación de la infección depende de la correlación de los signos clínicos con los hallazgos de laboratorio. Las pruebas como PCR y diagnóstico serológico tienen alta sensibilidad, pero deben ser interpretadas en contexto, ya que algunas infecciones pueden no presentar síntomas claros o estar en fases subclínicas.

Recomendaciones y medidas preventivas

Para fortalecer la vigilancia epidemiológica y el control de las enfermedades de denuncia obligatoria, es fundamental que los médicos veterinarios adopten estrategias preventivas efectivas. La correcta aplicación de estas medidas no solo protege la salud de los animales, sino que también previene la transmisión de enfermedades zoonóticas y contribuye a la salud pública.

Se presentan algunas recomendaciones clave,

- **Capacitación continua y actualización profesional.**
- **Implementación de protocolos de bioseguridad en clínicas y laboratorios.**
- **Estrategias de vigilancia y notificación oportuna.**
- **Educación y concientización de los propietarios de animales.**

En síntesis, la aplicación de estas recomendaciones no solo mejora la vigilancia epidemiológica de las enfermedades de denuncia obligatoria, sino que también refuerza el papel del médico veterinario y del laboratorio como actores clave en la protección de la salud pública. La prevención y el control de las zoonosis requieren un compromiso colectivo, en el que la educación, la notificación responsable y de la colaboración interdisciplinaria bajo el enfoque de Una Salud.

Referencias

Argentina.gob.ar. (s/f). Argentina.gob.ar. Recuperado el 15 de marzo de 2025, de <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-15465-195093/actualizacion>

CVPBA. (s/f). Cvpba.org. Recuperado el 15 de marzo de 2025, de <https://cvpba.org/>

Departamento de zoonosis urbana, Dirección de epidemiología, Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires. (2020). *Normativa de notificación de enfermedades de denuncia obligatoria en veterinaria en pequeños animales (ENO)*. Disponible en: <https://cvpba.org/wp-content/uploads/2022/03/ENO-05-2020-1.pdf>

Facultad de Ciencias Veterinarias – FCV-UNLP. (s/f). Edu.ar. Recuperado el 15 de marzo de 2025, de <https://www.fcv.unlp.edu.ar/>

Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino. (s/f). Gov.ar. Recuperado el 15 de marzo de 2025, de <https://sisa.msal.gov.ar/sisa/>

CAPÍTULO 3

Toma de muestras - generalidades

María Fernanda Gomez

La toma de muestras en pequeños animales es un paso clave en el diagnóstico microbiológico, ya que determina la precisión de los resultados. Una recolección adecuada requiere identificar correctamente el sitio de infección, aplicar técnicas asépticas y utilizar medios de transporte apropiados, minimizando el tiempo hasta su procesamiento. Estos factores son esenciales para optimizar la identificación del agente etiológico y garantizar su diagnóstico bacteriológico, facilitando así un tratamiento oportuno de las infecciones.

Normas generales para la conservación y envío de muestras

- El paciente debe estar sin tratamiento antibiótico previo o el mismo debe ser suspendido 4 - 5 días antes como mínimo.
- Todas las muestras deben remitirse al laboratorio inmediatamente, de no ser posible se deberán almacenar a 4 °C por no más de 24 horas.
- No congelar las muestras.
- Asegurarse de que los recipientes estén bien rotulados, con la información del paciente, veterinario y datos de la muestra.
- Adjuntar el protocolo de envío de muestras.
- El transporte de la muestra implica una potencial fuente de contaminación y riesgo biológico para todas las personas durante el proceso.

Medidas de bioseguridad

La manipulación inadecuada de materiales o muestras clínicas representa un riesgo biológico tanto para las personas que están encargadas de su toma, recepción y procesamiento como para el ambiente. Por tal motivo, es fundamental utilizar los elementos de protección personal adecuados según el origen de la muestra, minimizando así la exposición a agentes potencialmente peligrosos.

Para asegurar un manejo seguro de muestras biológicas, se recomienda utilizar contenedores herméticos, resistentes a fugas y de fácil sellado para su transporte. En cuanto

a la manipulación de elementos cortopunzantes, deben observarse estrictamente las normas de bioseguridad: no reencapuchar agujas, emplear correctamente los dispositivos diseñados para su descarte y evitar el traslado de jeringas con agujas, transfiriendo el material aspirado a tubos estériles. En caso de producirse un accidente con riesgo biológico, es obligatorio notificarlo de manera inmediata conforme al protocolo institucional vigente para incidentes laborales de esta naturaleza.

Transporte de muestras con riesgo biológico

El recipiente primario, que contiene la muestra o cultivo, debe estar debidamente cerrado, rotulado y colocado dentro de un contenedor secundario que asegure su contención ante eventuales derrames. Este conjunto debe introducirse en un recipiente terciario o caja de transporte, correctamente identificado con la leyenda “infeccioso” y acompañado de los datos del remitente y del destinatario. Cuando se requiera el envío de múltiples contenedores secundarios, estos pueden ser agrupados en un mismo recipiente terciario, como una caja, termo o hielera, que garantice la protección del contenido frente a factores ambientales adversos, como el calor excesivo. En los casos que así lo demanden, debe mantenerse la cadena de frío mediante el uso de refrigerantes, asegurando que la temperatura se conserve dentro de los rangos establecidos para preservar la integridad de la muestra. Resulta indispensable, además, una adecuada coordinación entre todos los actores involucrados en el manejo, preparación y transporte de materiales potencialmente peligrosos, a fin de garantizar un traslado seguro, eficiente y conforme a las normativas de bioseguridad vigentes.

Factores que influyen en el aislamiento del agente bacteriano

El éxito en el aislamiento del agente bacteriano responsable de una infección depende de múltiples factores, que pueden afectar la viabilidad y recuperación de los microorganismos en el laboratorio:

- **Localización** del proceso infeccioso.
- **Técnica y material** utilizado para recolectar la muestra.
- **Medio de transporte** en el cual la muestra es colocada.
- **Tiempo** transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento en el laboratorio.
- **Localización del proceso infeccioso**

La ubicación de la infección influye en la cantidad y tipo de microorganismos presentes, así como en la dificultad para obtener una muestra representativa. La identificación del sitio de infección es clave para determinar el tipo de muestra a recolectar y el posible agente causal.

Según la localización, las áreas del cuerpo pueden clasificarse en:

- **Áreas estériles¹**: cualquier bacteria aislada en estos sitios tiene alta relevancia clínica.
- **Áreas colonizadas²** es fundamental diferenciar entre la microbiota normal y los agentes patógenos.
- **Infecciones profundas** o en tejidos con baja carga bacteriana: requieren muestras obtenidas mediante técnicas invasivas, como biopsias o aspirados profundos.

En pequeños animales, algunas localizaciones frecuentes de infección incluyen:

- **Piel y oído**: piodermas, otitis externa.
- **Sistema respiratorio**: neumonía, traqueobronquitis infecciosa (“tos de las perreras”).
- **Tracto urinario**: infección urinaria, pielonefritis.
- **Tracto digestivo**: diarreas bacterianas, infecciones gastrointestinales.
- **Sistema nervioso central**: meningitis bacteriana.
- **Sangre**: bacteriemia, sepsis.

Técnica y material utilizado para recolectar la muestra

La recolección debe realizarse de forma aséptica para evitar la contaminación y los falsos positivos. En la tabla 3.1 se mencionan ejemplos de tipos de muestras y técnicas adecuadas para su obtención en pequeños animales y los dispositivos de recolección (Figura 3.1).

Tabla 3.1

Tipo de muestra, técnica de recolección y material utilizado

Tipo de muestra	Técnica de recolección	Material utilizado
Muestras de piel	Raspado cutáneo, biopsia o punción de absceso	Bisturí, aguja estéril, tubo seco o con solución salina
Exudados óticos	Hisopado profundo del conducto auditivo externo	Hisopo estéril con medio de transporte
Secreciones nasales o traqueales	Hisopado nasal o lavado traqueal	Hisopo estéril, jeringa con solución fisiológica
Orina	Cistocentesis, micción espontánea, cateterización	Tubo estéril, frasco con conservante si es necesario
Heces	Recolección directa del recto o deposición reciente	Frasco estéril, medio Cary-Blair para patógenos entéricos
Sangre	Venopunción aséptica	Hemocultivo
Líquido cefalorraquídeo	Punción lumbar bajo sedación	Tubos estériles sin anticoagulante

¹ Sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, articular, peritoneal.

² Piel, tracto respiratorio superior, intestino, tracto urogenital.

Procedimiento para la toma de muestras

Exudados óticos

- Limpiar cuidadosamente el oído externo con solución fisiológica estéril y secar con una gasa estéril para eliminar posibles contaminantes externos.
- Utilizar un hisopo estéril para la recolección de la muestra, asegurándose de introducirlo en el conducto auditivo externo (CAE) y girarlo suavemente para obtener suficiente material.
- Colocar el hisopo en un tubo con medio de transporte estéril, asegurándose de que quede bien sellado para su conservación y posterior análisis.

Figura 3.1

Dispositivos de recolección de muestras



Nota. a: Tubos estériles. b: Bolsas estériles. c: Recipiente estéril. D: Hisopo estéril. e: Medio de transporte Stuart. F: Jeringa descartable.

Lavados endoscópicos

- Asegurarse de que el endoscopio esté limpio y esterilizado antes de su uso para evitar contaminación de la muestra.
- Recoger la muestra en un recipiente estéril.

Secreciones y exudados

- Limpiar la zona con solución fisiológica estéril para eliminar costras y exudados.
- Utilizar un hisopo estéril para frotar enérgicamente la mucosa de la zona (ej. fosa nasal, fondo de vagina) o una jeringa estéril en el caso de punciones.

- Colocar el hisopo en tubo con medio de transporte estéril.

Orina

- Utilizar material estéril para la recolección, incluyendo jeringas, sondas y recipientes.
- La recolección por cistocentesis o sondaje es el método de elección, ya que minimiza la contaminación con microorganismos de la uretra o el ambiente.
- En caso de utilizar cistocentesis, desinfectar la piel del abdomen antes de la punción y emplear una aguja estéril conectada a una jeringa.
- Si se realiza por sondaje, utilizar una sonda estéril y asegurarse de un procedimiento aséptico.
- Una vez obtenida la muestra, transferirla de inmediato a un recipiente estéril.

Materia fecal

- Toma directa del recto: Utilizar guantes estériles para la manipulación. Introducir suavemente un hisopo estéril en el recto y girarlo para obtener una muestra representativa. Colocar el hisopo en un tubo con medio de transporte estéril y asegurarse de que quede bien sellado.
- Recolección de heces recién emitidas: tomar una porción de la parte central de la deposición con un hisopo estéril o espátula limpia, evitando el contacto con superficies externas. Transferir la muestra a un recipiente estéril con tapa hermética.
- Muestras de necropsia: Extraer un fragmento de asas intestinales con su contenido fecal. Atar los extremos de las asas intestinales para evitar derrames y contaminación cruzada. Colocar el tejido en un recipiente estéril y refrigerar si el análisis no se realiza de inmediato.
- Cantidad de muestra recomendada para muestras individuales: recolectar aproximadamente 20 gramos de materia fecal por animal en un frasco estéril.

Sangre

- Cortar el pelo en el punto de la punción venosa (yugular).
- Limpiar la zona con solución jabonosa, secar, y frotar con antiséptico (alcohol yodado o iodopovidona), dejar secar.
- Extraer la muestra de sangre, cambiar la aguja por una nueva (cono verde) y transferir al frasco de hemocultivo.
- Desinfectar el punto de punción y tapar estérilmente.
- Muestras: Remitir en frascos para hemocultivo (mejor que en tubos con heparina), que contienen anticoagulante y medio enriquecido para el desarrollo de patógenos bacterianos; se pueden utilizar frascos destinados a agentes con requerimientos nutritivos comunes o frascos específicos para bacterias anaeróbicas, que mantienen una atmósfera rica en dióxido de carbono, en cuyo caso es importante retirar la aguja acoplada a la jeringa para evitar la pérdida de gas.

- Condiciones: Extraer la muestra durante el pico de temperatura de la enfermedad y cuando el animal no haya recibido antibióticos en las últimas 48 horas.
- Transportar a temperatura ambiente o corporal.

Medio de transporte de uso en bacteriología

El medio de transporte debe preservar la viabilidad del agente bacteriano y prevenir la proliferación de microbiota contaminante. No todas las muestras requieren la utilización de medios de transporte,

- **Muestras sin medio de transporte:** líquidos estériles (LCR, líquidos articulares, órganos) pueden enviarse en tubos estériles.
- **Medios de transporte específicos**
 - **Cary-Blair** para materia fecal.
 - **Amies o Stuart** para exudados y secreciones.
 - **Frascos de hemocultivo** con caldo enriquecido.
 - **Caldo tioglicolato** para microorganismos anaerobios.

Condiciones de conservación de las muestras

- Para evitar el deterioro, los líquidos estériles deben procesarse rápidamente.
- La mayoría de las muestras se conservan en refrigeración (2 - 8 °C).
- No refrigerar las muestras en las que se sospeche la presencia de anaerobios, estreptococos o *Neisseria* spp.

El cumplimiento riguroso de los procedimientos de toma de muestras en pequeños animales no solo mejora la confiabilidad de los análisis microbiológicos, sino que también contribuye a una mejor vigilancia epidemiológica y al uso racional de antimicrobianos.

El conocimiento en estos aspectos resulta fundamental para fortalecer el diagnóstico microbiológico, garantizando la toma de decisiones clínicas y la implementación de estrategias efectivas en el control de enfermedades infecciosas en pequeños animales.

Figura 3.2*Protocolo de envío de muestras*





Propietario:				Dirección:		
Localidad:				e-mail:		
Teléfono:						
Profesional actuante:				Teléfono:		
Localidad:				CP:		e-mail:
Remitir resultado a:						

Datos de la muestra

N° muestra	Fecha	Especie	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Técnica de muestreo
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		
				M / H		

Estudio solicitado:

¿Recibió tratamiento antibiótico?	S / N
¿Con cuál/es antibiótico/s?	
¿Por cuantos días?	
Fecha del último tratamiento	

Hallazgos clínicos relevantes:

Diagnostico presuntivo:

Ante la duda, comunicarse al +54 (221) 15-501-1567 // sedibya.fcv.unlp@gmail.com

La OMS ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad. El uso indebido y excesivo de antimicrobianos es el principal factor que determina la aparición de patógenos farmacorresistentes.

Referencias

- Love, B.C. y Jones, R.L. (2012). Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections. En C.E. Greene (Ed. 4th), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 277-280). Elsevier.
- OPS-OMS. (2017). *Manual Veterinario de Toma y Envío de Muestras*. PANAFTOSA - OPS/OMS.
- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. OMS. (Ed. 3^o). https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43255/9243546503_spa.pdf?sequence=1
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020*. Organización Mundial de la Salud. (WHO/WHE/CPI/2019.20). Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

CAPÍTULO 4

Observación y tinciones

Camila Aurnague y Raúl Emilio Iza

Desde un punto de vista histórico, la ciencia de la microbiología floreció cuando se logró observar los microorganismos. El microscopio es un elemento fundamental para el estudio de la diversidad microbiana. En este capítulo se describirán los tipos de microscopios y las técnicas utilizadas para observar bacterias.

Tipos de microscopios

Los microorganismos pueden observarse con microscopios ópticos (MO) o electrónicos (ME). En general, la microscopía óptica se refiere al empleo de cualquier tipo de microscopio que utilice luz visible para observar la muestra.

Los MO se usan para observar células intactas con aumentos relativamente bajos. En contraposición, el ME utiliza un haz de electrones en lugar de luz y se emplea para observar estructuras internas o detalles superficiales de las células a grandes aumentos.

Tan importante como el aumento de tamaño es la resolución³. Mientras que el aumento puede incrementarse prácticamente sin límite, la resolución está determinada por las propiedades físicas de la luz. La resolución, y no el aumento, es lo que marca los límites de lo que se puede ver al microscopio.

Microscopio óptico

En función de las características de las lentes, los microscopios se clasifican en **simples**, poseen un solo tipo de lente y **compuestos**, cuentan con un sistema de lentes.

³ El poder de resolución es la distancia mínima a la que se pueden distinguir dos puntos. Este límite está determinado por la longitud de onda de la fuente de iluminación, en este caso la luz visible. Los MO tienen un límite máximo de resolución de 0,2 μm ; ME aumenta 1000 veces la resolución del MO ya que la longitud de onda de los electrones es alrededor de 100.000 veces menor que la de la luz visible.

Un conjunto de lentes finamente talladas forma una imagen focal definida cuyo tamaño es muchas veces mayor que el de la muestra en sí. Este aumento se logra cuando los rayos luminosos que proceden de la fuente de luz pasan a través de un condensador que tiene lentes que los dirigen a través de la muestra. Desde allí, los rayos pasan al interior de la lente objetivo, que es la más próxima a la muestra. La imagen vuelve a ser ampliada por el ocular.

El aumento total de la imagen se calcula multiplicando el aumento del objetivo por el del ocular. La mayoría de los MO utilizados en microbiología, poseen tres lentes objetivo: 10 X (bajo aumento), 40 X (gran aumento) y 100 X (de inmersión en aceite). La mayoría de los oculares amplían la imagen 10 veces (10 X). De la multiplicación surge que el aumento total de las imágenes puede ser 100 X con bajo aumento, 400 X con gran aumento y 1000 X con inmersión.

En bacteriología se utilizan diferentes tipos de MO compuesto, el de campo claro y los MO compuesto modificado como, campo oscuro, contraste de fases y fluorescencia.

MO de campo claro

La mayoría de los MO de uso rutinario son de **campo claro**, donde la luz visible atraviesa el diafragma, el objetivo y el ocular sin sufrir modificaciones, permitiendo la observación directa de la muestra. Cuando se enfoca la luz, el condensador produce una iluminación brillante (campo claro) (Figura 4.1).

Figura 4.1

Microscopio óptico de campo claro



Nota. A: ocular. B: objetivos. C: diafragma y condensador. D: fuente de luz.

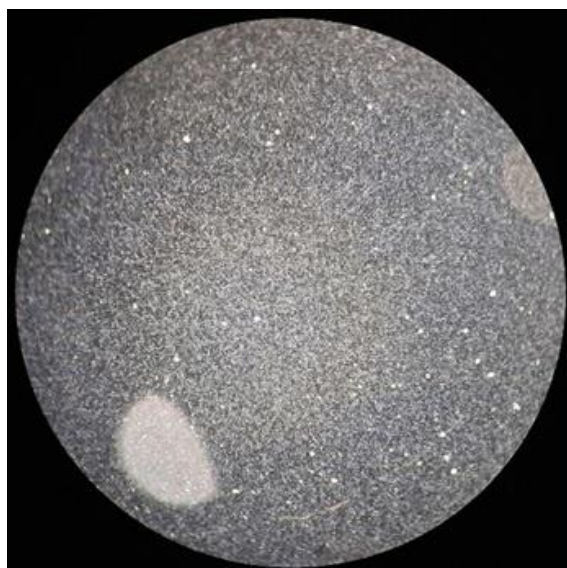
Microscopio de campo oscuro

El microscopio de campo oscuro se utiliza para examinar microorganismos vivos que no son visibles con el MO común, que no pueden teñirse con los métodos estándares o que resultan tan distorsionados por las tinciones que sus características no pueden identificarse.

En el microscopio de campo oscuro, el contraste se obtiene al bloquear la luz directa con un condensador especial que incluye un disco opaco, permitiendo que solo los rayos de luz oblicuos incidan sobre la muestra. Como no hay una luz de fondo directa, la muestra aparece iluminada contra un fondo negro, es decir el campo oscuro. Esto genera una imagen brillante similar a un cielo estrellado sobre un fondo oscuro, lo que facilita la observación de microorganismos de difícil visualización como leptospiras y treponemas (Figura 4.2).

Figura 4.2

Observación de Leptospira spp con microscopio de fondo oscuro



Nota. Magnificación 100 X.

Microscopio de contraste de fase

El microscopio de contraste de fase es especialmente útil, ya que permite la observación detallada de estructuras internas en los microorganismos vivos. No es necesario fijar ni teñir la muestra, procedimientos que podrían distorsionar o destruir a los microorganismos. El principio de este microscopio se basa en la naturaleza ondulatoria de los rayos de luz y en el hecho de que los rayos pueden estar en fase (picos y valles coinciden) o fuera de fase.

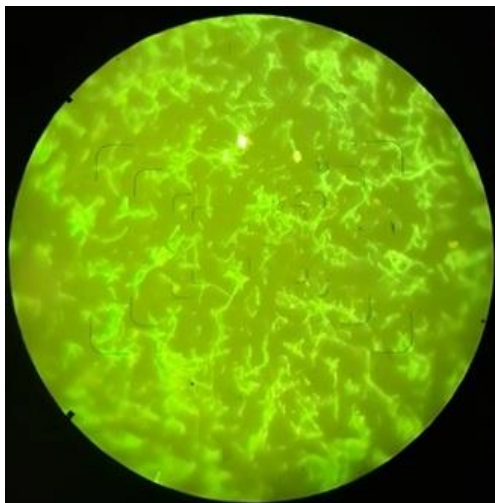
Microscopio de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia emplea muestras tratadas con sustancias fluorescentes que absorben luz de una longitud de onda corta (ultravioleta) y emiten luz en una longitud de onda mayor (visible). Este fenómeno permite resaltar estructuras celulares que posean afinidad por la molécula fluorescente y así facilitar su identificación. Cuando los microorganismos

teñidos con un fluorocromo se examinan mediante un microscopio de fluorescencia con una fuente de luz ultravioleta o cercana a ella, aparecen como objetos luminiscentes y brillantes contra fondo oscuro (Figura 4.3).

Figura 4.3

Observación de Clostridium spp. con microscopio de fluorescencia

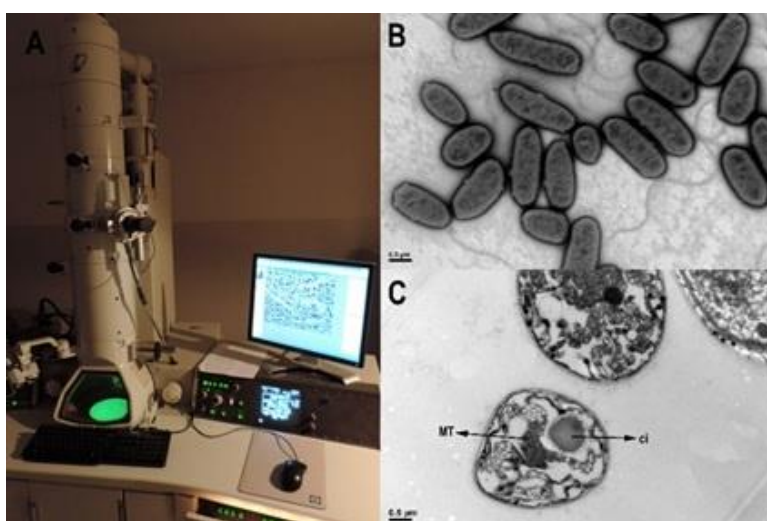


Nota. Magnificación 1000 X.

Como se mencionó, el ME se emplea para observar estructuras internas o detalles superficiales de las células a grandes aumentos.

Figura 4.4

Microscopio electrónico de transmisión



Nota. A: Microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II del Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. B: *Pseudomonas*

aeruginosa. Contraste negativo. Magnificación 25.000 X. C:
Raphidiopsis mediterránea, cianobacteria de agua dulce. Corte
 transversal. MT: membranas tilacoides. ci: gránulo de cianoficina.
 Contraste positivo. Magnificación 25.000X.

Preparación de muestras para observación microscópica

Con la finalidad de obtener una imagen clara con detalles precisos para ser observadas por MO, las muestras deben teñirse de tal modo que contrasten nítidamente con el medio que las rodea, es decir, con la sustancia en la cual están suspendidas. Para lograr este contraste es necesario cambiar el índice de refracción⁴ de la muestra con respecto al medio. Una estrategia para poder hacerlo son las técnicas de tinción.

Los pasos previos a las tinciones se muestran en la Figura 4.5 y la Figura 4.6.

Tinciones: uso y fundamento

En la observación microscópica por **tinción**, el uso de colorantes permite teñir las células y mejorar el contraste. Si bien este procedimiento implica la muerte celular debido a los métodos de fijación, posibilita la visualización de estructuras bacterianas, su disposición y diferenciación según la composición química. La coloración final dependerá de la afinidad tintorial que tengan las estructuras constitutivas y accesorias de los microorganismos presentes en la muestra.

Su resultado facilitará la selección de medios de cultivo adecuados y la optimización de los procedimientos para el diagnóstico microbiológico.

Con excepción de algunas tinciones particulares, es fundamental realizar previamente una serie de pasos.

1. **Extendido:** se extiende una delgada película de la muestra sobre la superficie del portaobjetos. Si la muestra es una colonia bacteriana, se coloca previamente una gota de agua destilada estéril para facilitar su dispersión y extenderla uniformemente.
2. **Secado:** una vez realizado el extendido, se debe secar a temperatura ambiente o mediante la aplicación de calor indirecto utilizando el mechero de Bunsen. Para ello, se recomienda realizar movimientos en vaivén, asegurando la distribución uniforme del calor.
3. **Fijación:** este paso tiene como objetivo adherir la muestra al portaobjetos y evitar su desprendimiento durante la tinción. Existen dos métodos principales de fijación:

⁴ El índice de refracción es una medida de la capacidad de un medio de producir la deflexión de la luz.

- **Fijación física:** también conocida como "técnica de Koch", consiste en pasar el portaobjetos tres veces a través de la llama de un mechero de Bunsen en un ángulo de 45 °. Es importante evitar el sobrecalentamiento para no distorsionar la morfología bacteriana.
- **Fijación química:** implica el uso de agentes químicos, como metanol al 95 % o acetona, los cuales desnaturalizan las proteínas celulares sin alterar significativamente la estructura bacteriana. Se aplican sobre la muestra y se deja actuar durante un minuto.

Figura 4.5*Preparación del material para las tinciones*

Nota. De izquierda a derecha: identificación del portaobjetos; esterilización del ansa; toma de muestra.

Principales tinciones utilizadas en bacteriología: su uso y fundamento

Las tinciones se clasifican en simples o compuestas, según el número de colorantes empleados:

- **Tinciones simples:** utilizan solo un colorante para resaltar la morfología de los microorganismos.
- **Tinciones compuestas:** emplean más de un colorante para diferenciar tipos celulares o estructuras específicas, un mordiente y un decolorante.

Tinciones simples

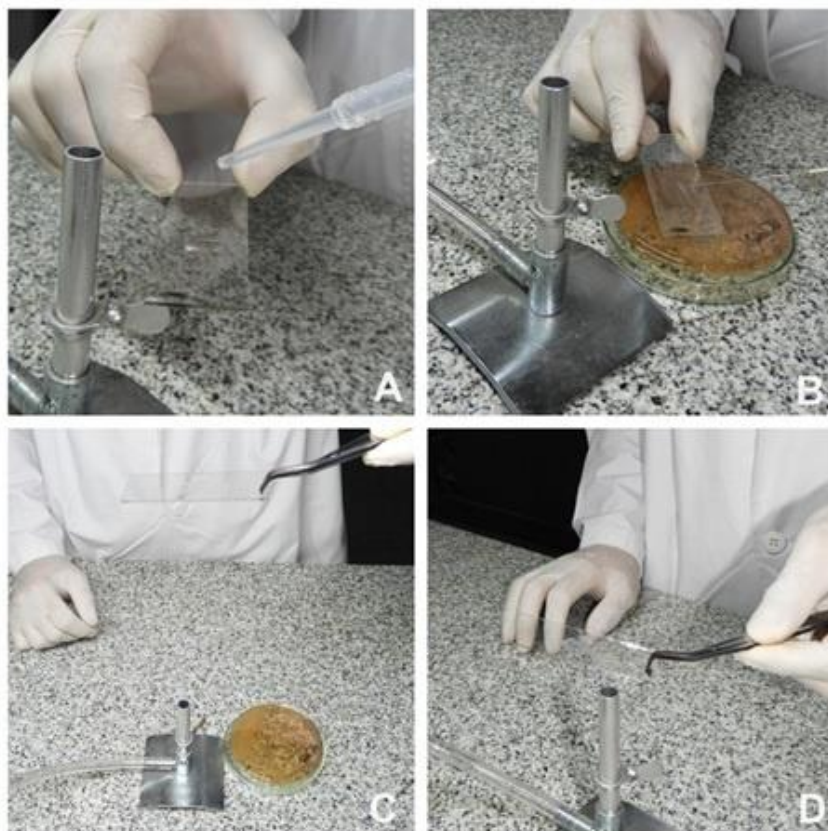
Una tinción simple es una solución acuosa o alcohólica de un colorante básico único. Aunque los diferentes colorantes se unen específicamente a las distintas partes de las células,

el propósito principal de una tinción simple es destacar el microorganismo completo para que se vean las formas y las estructuras celulares básicas.

Algunas de las tinciones simples más utilizadas en los laboratorios de bacteriología son: azul de metileno y Giemsa.

Figura 4.6

Preparación de extendidos para su posterior tinción



Nota. A y B: extendido. C: secado. D: fijado por método de Koch.

Azul de metileno

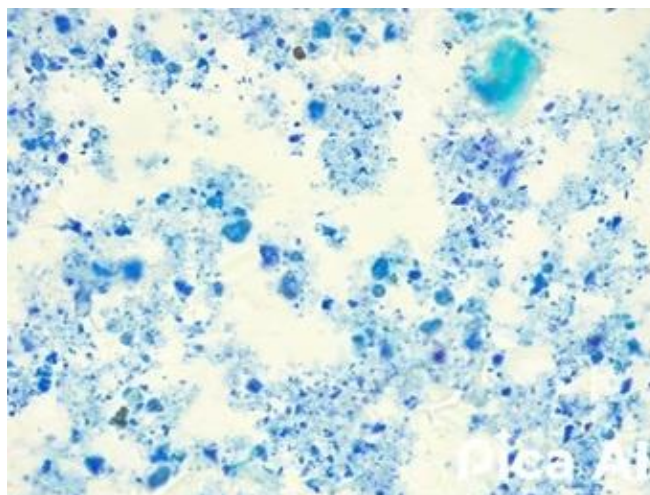
La tinción con azul de metileno es una de las más sencillas y ampliamente utilizadas en microbiología. Este colorante básico tiene una fuerte afinidad por los ácidos nucleicos y otras estructuras celulares con carga negativa, lo que permite resaltar la morfología de los microorganismos de manera rápida y eficiente. Se utiliza de rutina y observan bacterias, células epiteliales y estructuras celulares provenientes de muestras biológicas.

- **Fundamento:** el azul de metileno es un colorante catiónico que se une a los componentes aniónicos de las células, tiñéndolas de un azul intenso.
- **Procedimiento:** se aplica una solución hidroalcohólica de azul de metileno durante un minuto, se enjuaga con agua y se deja secar.

- **Interpretación:** todas las estructuras celulares y bacterianas presentes en la muestra se observarán de color azul, lo que permitirá un análisis rápido de su morfología.

Figura 4.7

Tinción de materia fecal de un perro con la tinción azul de metileno



Nota. Magnificación 1000 X.

Tinta china

- **Fundamento:** la observación con tinta china es una técnica de tinción negativa que permite visualizar las cápsulas bacterianas o fúngicas. Debido a que la tinta china no penetra en la cápsula, se observa un halo claro alrededor de la célula teñida, lo que permite su identificación microscópica.
- **Procedimiento:** centrifugar la muestra a observar para concentrar los microorganismos presentes en ella. Homogeneizar el sedimento con una gota de tinta china en un portaobjetos y por último colocar un cubreobjetos. Para una correcta visualización, utilizar los objetivos de 10X o 40X.
- **Interpretación:** las cápsulas aparecen como halos transparentes rodeando las células.

Giemsa

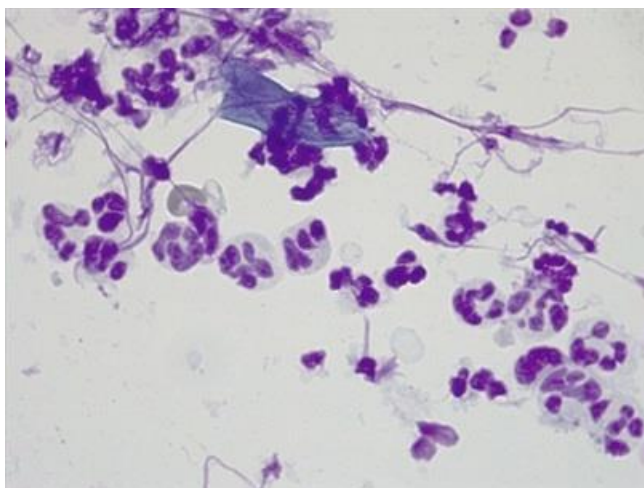
- **Fundamento:** la tinción de Giemsa es una técnica ampliamente utilizada en microbiología y hematología para la identificación de bacterias intracelulares, protozoos y células sanguíneas. Su principio se basa en la combinación de colorantes básicos (azul de metileno, azure A y B) y ácidos (eosina), permitiendo una diferenciación clara entre estructuras celulares y microorganismos. El Azure B se une a los ácidos nucleicos, tiñendo los núcleos celulares de azul o morado, mientras que la eosina Y resalta el citoplasma de color rosado. En microbiología, se emplea especialmente para

la identificación de *Chlamydia* y *Rickettsia*, ya que resalta sus cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos mediante un contraste característico.

- **Procedimiento:** Una vez tomada la muestra, ya sea una impronta, un frotis o un extendido, se procede al secado (por aire) y al fijado con alcohol etílico absoluto durante 2 o 3 minutos. Colocar la solución de Giemsa diluida durante 20 minutos y luego lavar suavemente, con agua corriente y secar. Dejar secar a temperatura ambiente y observar en un microscopio óptico de campo claro
- **Interpretación:** *Las células sanguíneas se ven de color rosado anaranjado, las bacterias y núcleos de color azul.*

Figura 4.8

Tinción de Giemsa



Nota: Impronta de dermatitis digital canina. Magnificación 1000 X.

Tinciones compuestas

A diferencia de las tinciones simples, las compuestas o diferenciales reaccionan de modo diferente con las distintas clases de bacterias y por lo tanto, pueden ser empleadas para establecer una distinción entre ellas. Las tinciones diferenciales utilizadas con más frecuencia para las bacterias son la de Gram y la de Zhiel Neelsen.

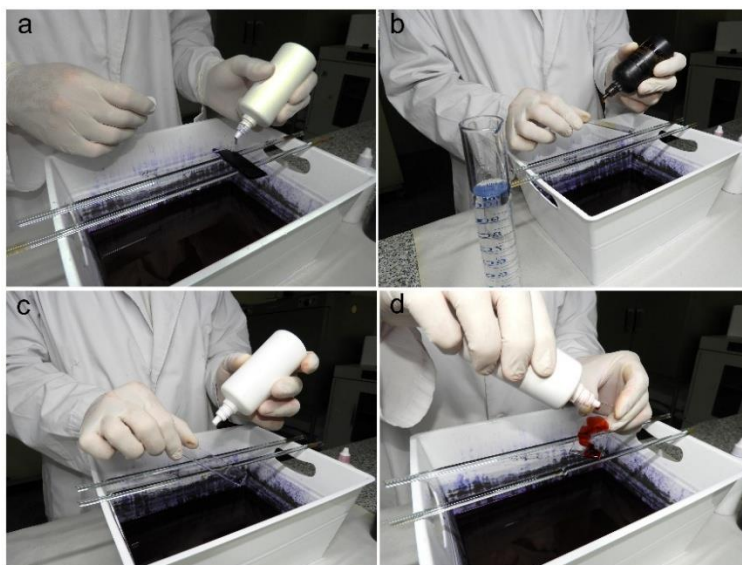
Los componentes son el colorante primario, el colorante secundario o de contraste, el decolorante y el mordiente, que tiene como función intensificar la coloración.

Tinción de Gram

- **Fundamento:** las bacterias gram positivas poseen una gruesa capa de peptidoglicano, que atrapa el complejo cristal violeta-lugol (CV-L), confiriéndoles una coloración violeta intensa tras la tinción. Las bacterias gram negativas, debido a la delgada capa de peptidoglicano y a la membrana externa rica en lípidos, alterados por acción del decolorante, no retienen la macromolécula CV-L y se tiñen con el colorante secundario, safranina, que les confiere una coloración rosada.
- **Procedimiento:** cubrir el extendido con el cristal violeta (colorante primario) durante un minuto y enjuagar con agua. Cubrir con lugol (mordiente), dejar actuar un minuto y lavar. Posteriormente se coloca el decolorante (alcohol-acetona), que se enjuaga rápidamente. Por último, se coloca la safranina (colorante secundario), se deja actuar un minuto y se lava nuevamente.
- **Interpretación:** las bacterias gram positivas se tiñen de violeta y las gram negativas de rosa.

Figura 4.9

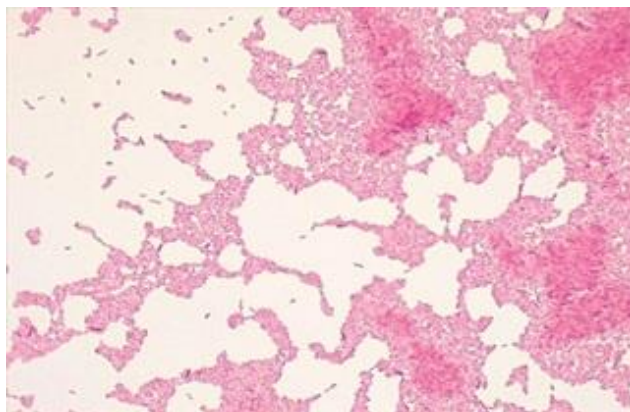
Secuencia de pasos de la tinción de Gram



Nota. a: cristal violeta. b: lugol. c: decolorante. d: safranina.

Figura 4.10.1

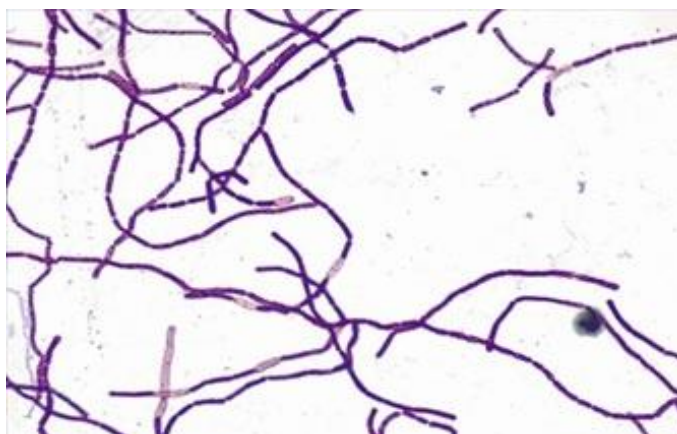
Tinción de Gram



Nota. Bacilos de gram negativos. Magnificación 1000 X

Figura 4.10.2

Tinción de Gram



Nota. Bacilos gran positivos. Magnificación 1000 X

Tinción de Ziehl Neelsen

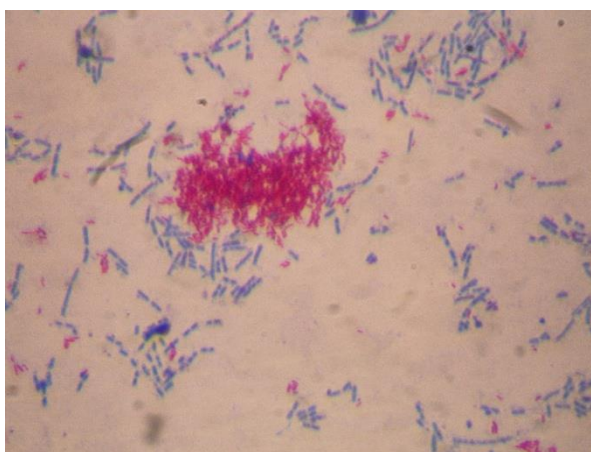
- **Fundamento:** la tinción de Ziehl-Neelsen se utiliza para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), como *Mycobacterium bovis*. La resistencia de estas bacterias a la decoloración con alcohol-ácido se debe a la presencia en su pared celular, de una capa lipídica rica en ácidos micólicos. La fucsina fenicada penetra esta estructura tras la aplicación de calor, permitiendo la tinción de las BAAR. Posteriormente, el alcohol-ácido elimina el colorante que no se haya fijado. Las estructura de contraste se observan de color azul.
- **Procedimiento:** el colorante primario de la tinción es la fucsina fenicada de Ziehl. Se coloca sobre el extendido y se deja actuar durante 5 minutos. Esta tinción tiene dos mordientes, el químico que es el fenol incluido en el colorante primario y el físico que es calor. Un hisopo embebido en alcohol se pasa por debajo del portaobjetos hasta que se emitan vapores blancos. Acción que se realiza tres veces, evitando la ebullición

del colorante. Se lava con agua y se coloca el decolorante (alcohol-ácido) durante 2 minutos. Luego se enjuaga con agua y se coloca el colorante de contraste (azul de metileno) durante un minuto. Por último, se enjuaga nuevamente con agua y se deja secar a temperatura ambiente para su posterior observación.

- **Interpretación:** Los BAAR se observan de color fucsia mientras que el resto de las estructuras presentes en el extendido, de color azul.

Figura 4.11

Tinción de Ziehl-Neelsen



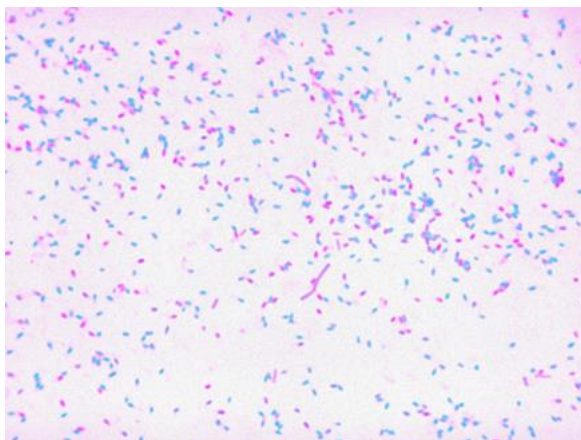
Nota. Magnificación 1000 X.

Tinciones especiales

Se incluyen dentro de las tinciones especiales, a aquellas que no se realizan de forma rutinaria en los laboratorios de bacteriología veterinaria, como la de Wirtz-Conklin para observación de esporas bacterianas, Stamp para observación de *Brucella* en muestras como exudados vaginales o material abortado.

Figura 4.12

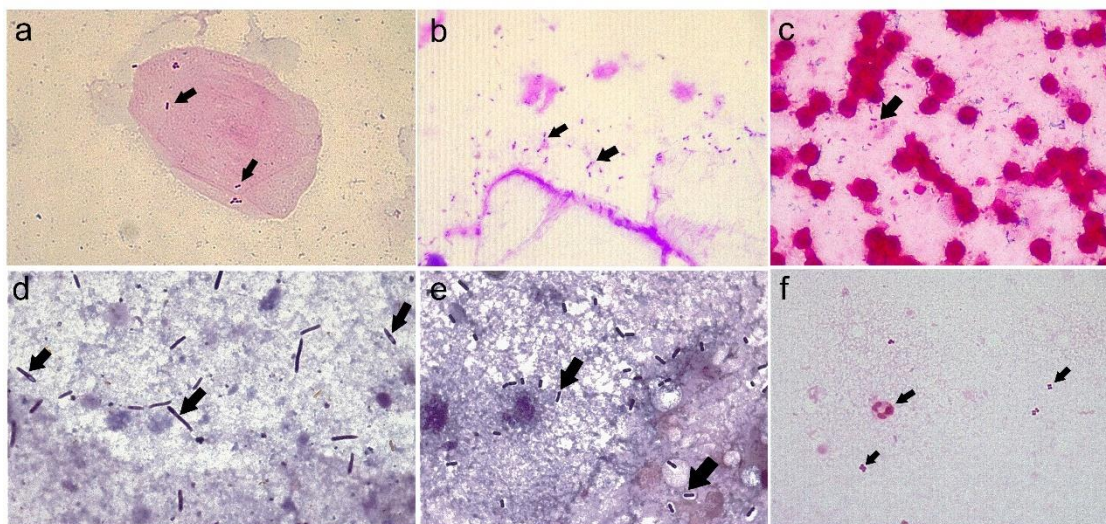
Tinción de Wirtz-Conklin para esporos



Nota. El extendido corresponde a un cultivo de *Clostridium* spp. Se observan las esporas bacterianas teñidas con el verde de Malaquita y las formas somáticas con la safranina. Magnificación 1000 X

Figura 4.13

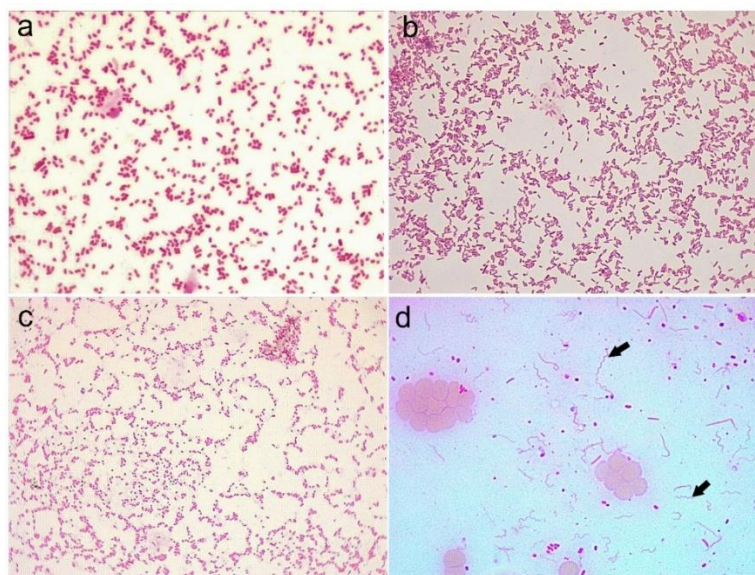
Observaciones directas de muestras clínicas con tinción de Gram



Nota. Las flechas negras destacan las bacterias presentes en las muestras. a: diplococos gram positivos y célula de descamación en el directo de un hisopado vaginal canino. b: cocobacilos gram negativos en el directo de un hisopado ótico canino. c: contenido de absceso, presencia de piocitos y bacteria gram negativas. d y e: extendidos de materia fecal con presencia de bacilos gram positivos. f: tinción de Gram de mucus vesical de un gato, presencia de polimorfonucleares y grupos bacterianos. Magnificación 1000 X.

Figura 4.14

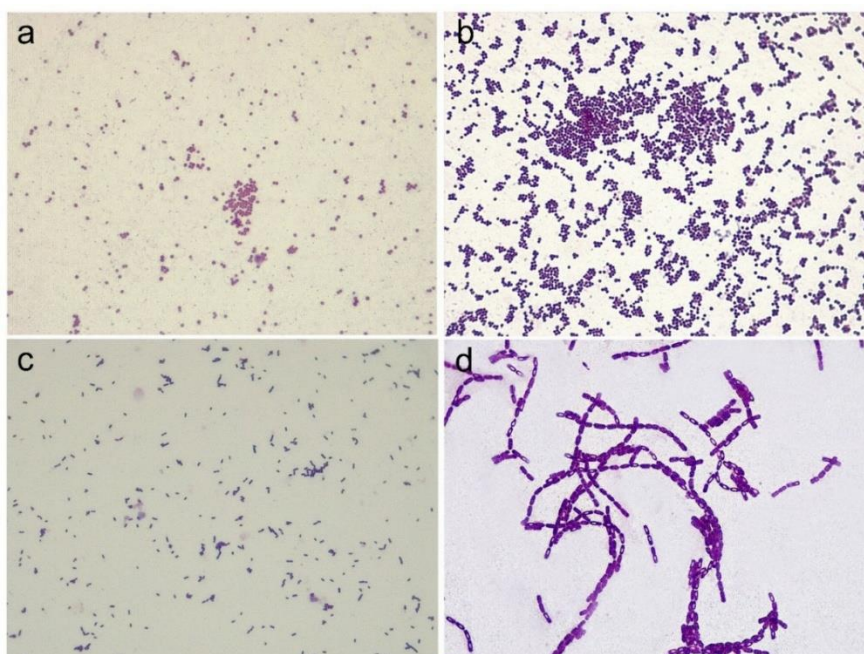
Cultivos bacterianos puros gram negativos



Nota. a: Moraxella spp. b: Pseudomonas aeruginosa. c: Escherichia coli. d: Treponema spp. Magnificación 1000 X.

Figura 4.15

Cultivos bacterianos puros gram positivos



Nota. a: Streptococcus spp. b: Staphylococcus spp. c: Trueperella pyogenes. d: Clostridium spp. Magnificación 1000 X.

Referencias

- Love, B.C. y Jones R.L. (2012). Mycoplasmal and Bacterial Diseases. C.E. Greene (4th) *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 277-282). Editorial Elsevier
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D. P. (2009). Un breve viaje por el mundo microbiano. En M.T. Madigan, J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark (Ed. 12°), *Brock. Biología de los microorganismos* (pp. 28-36). Pearson educación, S.A.
- Tunes, M.L. Observación microscópica. (2019). N.O. Stanchi y colaboradores (Ed. 2°). *Microbiología veterinaria* (pp. 43-50). Ed. Intermédica.
- Tórtora, G.J., Junke, B.R., Case, C.C. (2007). Observación de los microorganismos a través del microscopio. En G.J. Tórtora, B.R. Junke, C.C. Case (Ed. 9°), *Introducción a la microbiología* (pp 55-72). Editorial Médica-Panamericana.

CAPÍTULO 5

Cultivo y aislamiento bacteriano

Hernán Darío Nieves y Eliana Andrea Lorenti

Para cultivar microorganismos en el laboratorio es necesario reproducir todas las condiciones que tienen *in vivo*. Para ser exitosos en su aislamiento e identificación, es necesario brindarles las condiciones ambientales y requerimientos nutricionales específicos para cada grupo bacteriano.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo aportan los nutrientes esenciales para el desarrollo *in vitro* de microorganismos. Por ello, conocer su composición y finalidad es fundamental para garantizar el éxito del trabajo en el laboratorio. Por ejemplo, si el objetivo es favorecer el desarrollo de bacterias con requerimientos nutricionales exigentes, la elección del medio de cultivo será determinante; en este caso, un medio simple, como el agar tripteína soya, no será suficiente mientras que un medio enriquecido como el agar sangre, permitirá su desarrollo.

La elección del medio de cultivo también dependerá del origen de la muestra, si proviene de un área normalmente colonizada, intestino, piel, materia fecal, o de una normalmente estéril como líquido cefalorraquídeo, cerebro, pulmones.

Existen tres componentes básicos o mínimos que debe contener un medio de cultivo: peptona (fuente de carbono), agua destilada (medio acuoso) y cloruro de sodio (balance osmótico). A partir de esta base, diferentes sustancias se pueden adicionar y, así variar, su finalidad y utilización.

Es importante destacar que el desarrollo bacteriano en medio líquido se denomina población y en medio sólido colonia.

Al interpretar los resultados, es fundamental vincular el desarrollo bacteriano observado con la signología clínica del caso. La cuantificación de las colonias resulta especialmente útil, ya que un desarrollo escaso (pocas colonias) podría indicar una contaminación en la toma de la muestra o carecer de relevancia clínica. En contraste, un crecimiento abundante de un mismo tipo de colonia debe considerarse con atención, ya que es probable que corresponda al agente causal de la infección.

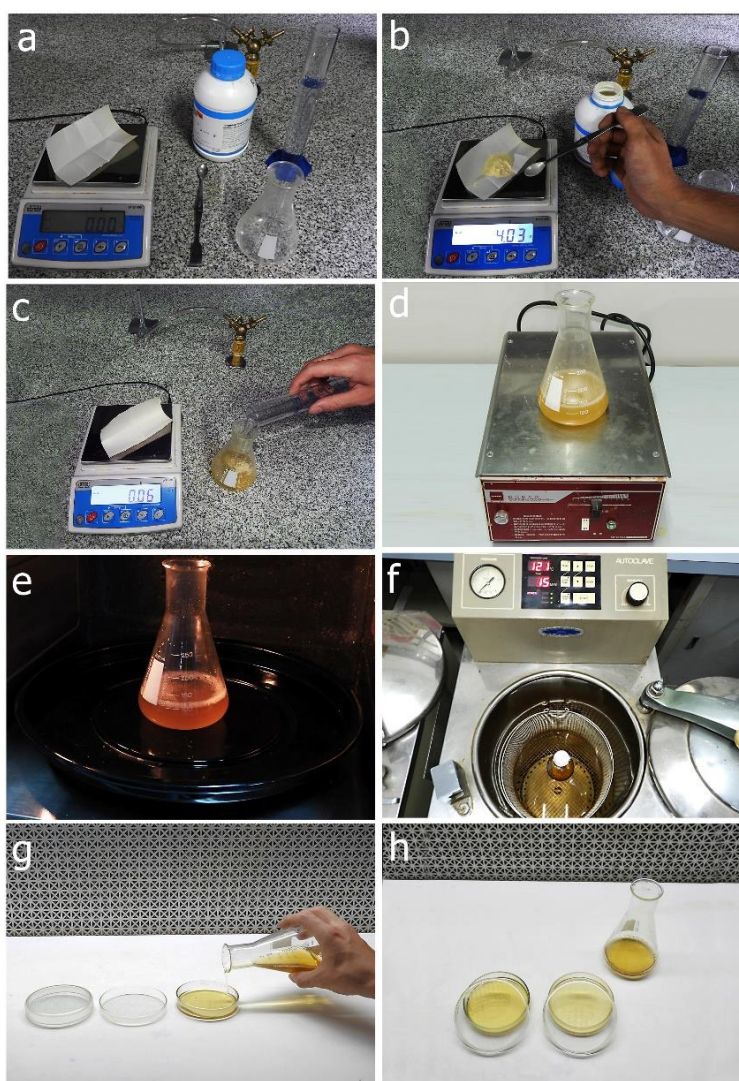
Preparación de los medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo es sencilla. La mayoría de ellos se comercializan en forma de polvo deshidratado y su elaboración se realiza según las indicaciones del fabricante.

A continuación, se presentan los materiales necesarios y los pasos a seguir para preparar un medio de cultivo comercial (Fig. 5.1).

Figura 5.1

Preparación de un medio simple: Agar Tripteína Soya



Nota. a: Elementos necesarios para la preparación de un medio de cultivo comercial. b: Pesaje. c: Dilución en agua destilada. d: Homogeneización en un agitador magnético. e: Disolución del medio con calor. f: Esterilización del medio en autoclave según las

indicaciones del producto. g: Distribución en placas de petri en flujo laminar. h: Solidificación del medio de cultivo.

Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se clasifican según su consistencia y según su finalidad.

La consistencia está determinada por el porcentaje de agar, un polisacárido derivado de algas marinas, presente en su composición. De acuerdo con esta proporción, los medios pueden ser líquidos (0 % de agar), semiblandos (0,7 %) o sólidos (2-3 %). Cuando se refiere a medios líquidos se citan como caldo, mientras que los sólidos como agar. En general, los medios líquidos se usan para obtener masa bacteriana, mientras que los sólidos se usan para aislamiento.

Clasificación de los medios de cultivo según su finalidad

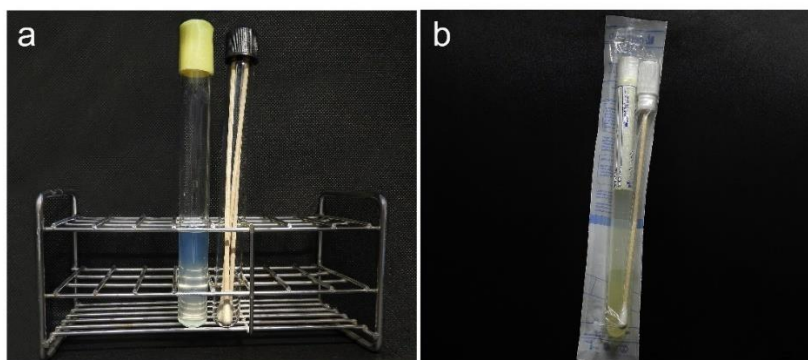
La finalidad de un medio de cultivo se relaciona con su propósito específico. Según esta clasificación, los medios de cultivo pueden ser de transporte, de enriquecimiento, simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales o selectivos-diferenciales y especiales.

Medios de transporte

En general, los medios de transporte están compuestos con agua, sales y un amortiguador de pH, lo que permite el mantenimiento de las muestras, pero no la multiplicación de los microorganismos presentes en ellas ya que no presentan fuentes de energía. Pueden ser líquidos o semisólidos; elaborarse en los laboratorios o comerciales. Los más utilizados son los medios de transporte Stuart y el Cary-Blair.

Figura 5.2

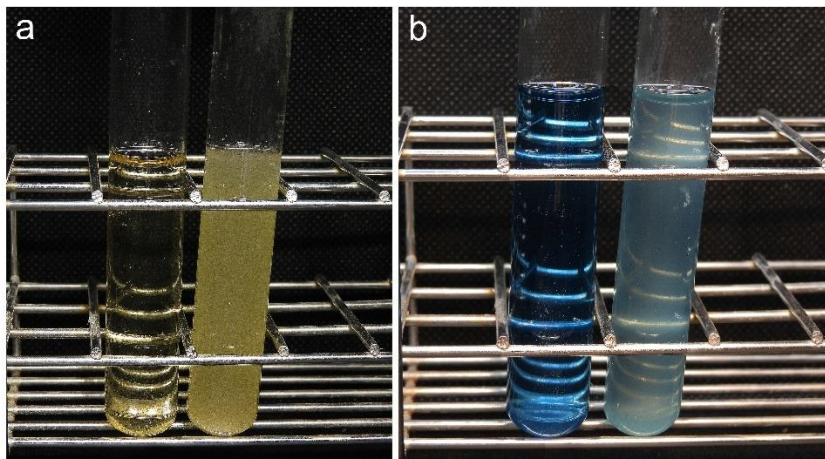
Medio de transporte Stuart



Nota. a: Medio de transporte Stuart junto a hisopos estériles para realizar la toma de muestra. B: Medio de transporte Stuart comercial.

Medios de preenriquecimiento y enriquecimiento

Los medios de preenriquecimiento y enriquecimiento son líquidos y tienen como finalidad estimular el desarrollo de las posibles bacterias presentes en una muestra. Contienen los nutrientes básicos para el desarrollo bacteriano, peptona y cloruro de sodio, como el agua peptonada. Si se incluyen sustancias inhibidoras, el enriquecimiento será selectivo como el caldo Rappaport-Vassiliadis utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de muestras de materia fecal, alimentos, entre otras. Esta selectividad se logra ya que el medio contiene altas concentraciones de sales de magnesio y sodio, un sistema buffer de fosfatos y verde de malaquita (colorante).

Figura 5.3*Medios de pre-enriquecimiento y enriquecimiento*

Nota. a: Agua peptonada *bufferada*. b: Caldo Rappaport-Vassiliadis. En las imágenes se observa el medio sin sembrar (tubo izquierdo) y el medio sembrado (tubo derecho), en donde el desarrollo bacteriano está indicado por la turbidez.

Medios simples

Los **medios simples**, líquidos o sólidos, no solo contienen los componentes básicos, sino que suman otros que promueven el desarrollo de **bacterias nutricionalmente no exigentes**. A modo de ejemplo, los de uso frecuente en los laboratorios de rutina bacteriológica son: agar tripteína de soya y agar nutritivo.

El agar tripteína soya (ATS) es el más utilizado con propósitos generales favoreciendo el desarrollo de una amplia variedad de bacterias. Contiene como fuente de nutrientes esenciales, tripteína y peptona de soya.

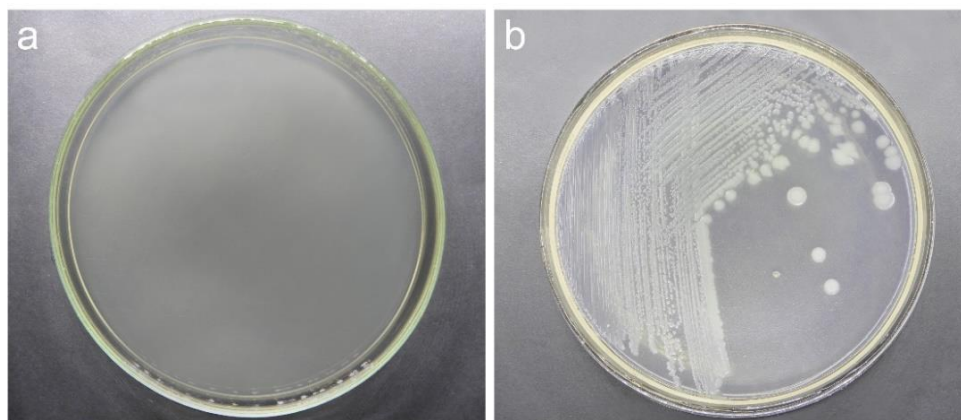
Figura 5.4*Agar tripteína soya*

Nota. a: Agar tripteína de soya. B: *Escherichia coli* en ATS luego de 24 horas de incubación. c: *Proteus* spp. en ATS luego de 24 horas de incubación.

El agar nutritivo (AN) contiene como fuente de nutrientes esenciales, pluripectona y extracto de carne.

Figura 5.5

Agar nutritivo



Nota. a: Agar nutritivo. b: desarrollo de *Escherichia coli* en AN luego de 24 horas de incubación.

Medios enriquecidos

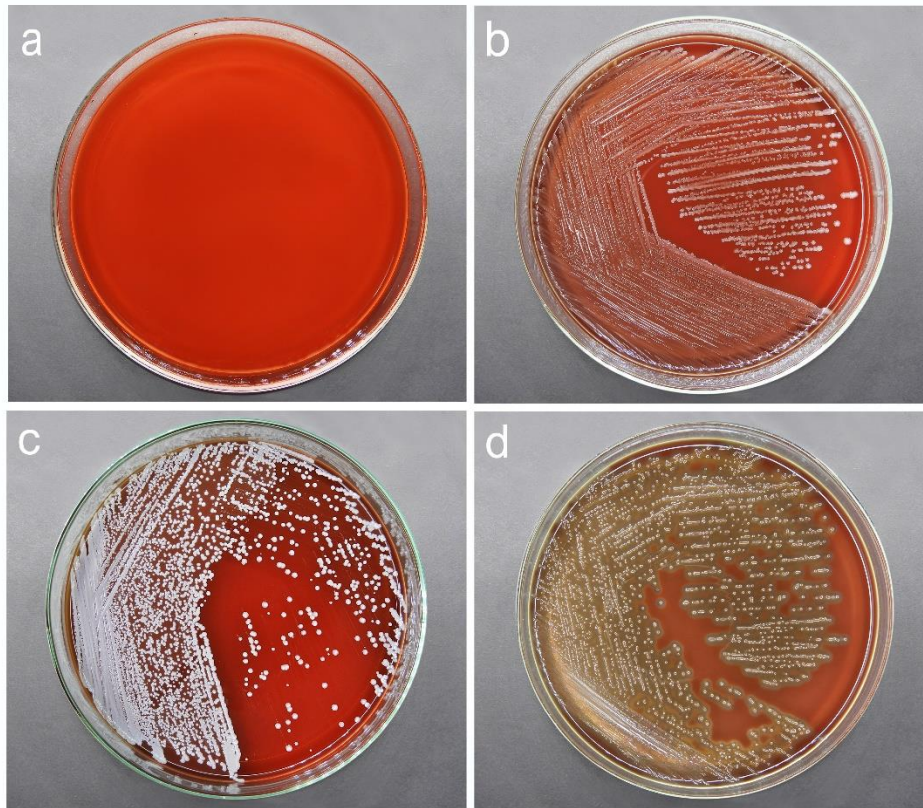
Los medios enriquecidos son medios simples suplementados con sustancias que permiten el desarrollo de **bacterias nutricionalmente exigentes**. Uno de los más utilizado es el agar sangre (AS), es un medio base que se le adiciona 5 - 10 % de sangre ovina desfibrinada a 45 °C. Permite observar la producción de hemólisis (lisis de los eritrocitos) por parte de las bacterias, convirtiéndose en un medio diferencial.

A diferencia del AS, en el agar chocolate la sangre desfibrinada se adiciona cuando el medio base, esterilizado con el autoclave, se encuentra a 80 °C. Lo que ocasiona la lisis de los glóbulos rojos, dejando disponibles en el medio factores de crecimiento como NAD (factor V) y hemina (factor X).

El medio cerebro-corazón, caldo o agar, es altamente nutritivo y permite el desarrollo de microorganismos nutricionalmente exigentes, aeróbicos y anaeróbicos. Además de la peptona, contiene infusión de cerebro de ternera e infusión de corazón vacuno, constituyendo las fuentes de energía para el desarrollo de las bacterias. El agar cerebro-corazón suele utilizarse como medio base para AS o agar chocolate.

Figura 5.6

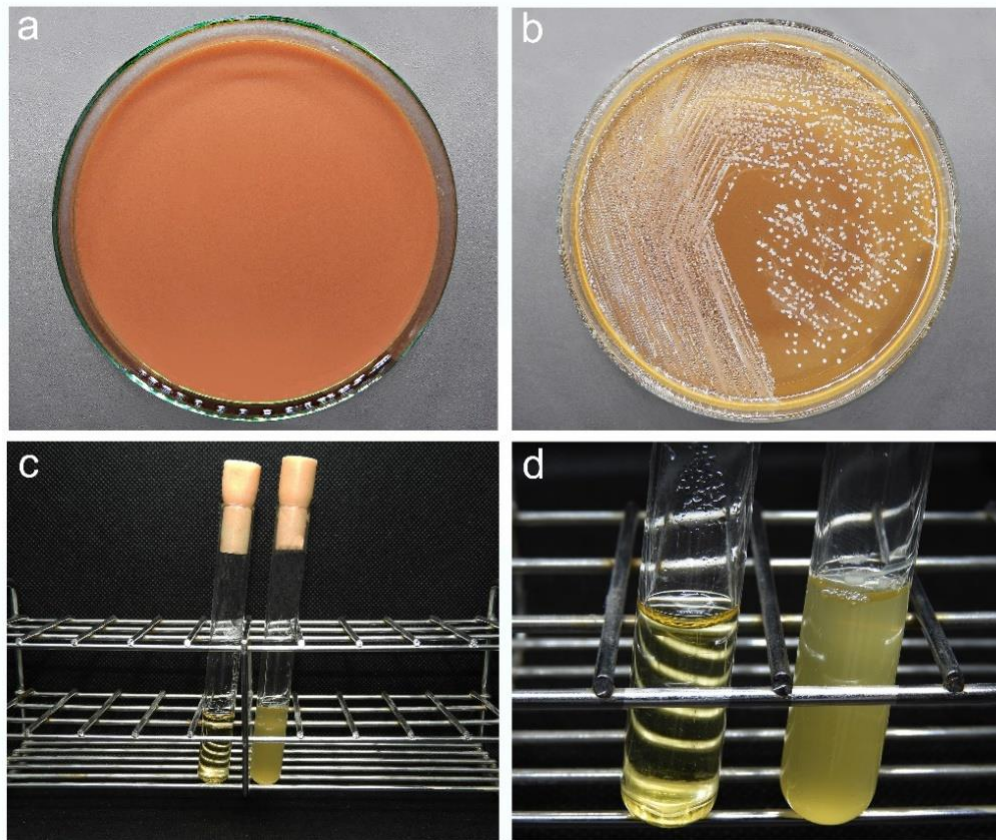
Agar sangre



Nota. a: Agar sangre. b: *Pasteurella multocida* en AS luego de 48 horas de incubación. c: *Staphylococcus aureus* en AS luego de 24 horas de incubación. d: *Streptococcus canis* en AS luego de 48 horas de incubación; alrededor de las colonias se observan zonas de β -hemólisis (lisis completa de los eritrocitos).

Figura 5.7

Otros medios enriquecidos



Nota. a: Agar chocolate. b: *Pasteurella multocida* en agar chocolate luego de 48 horas de incubación. c-d: Caldo cerebro-corazón, medio sin sembrar (tubo izquierdo) y medio sembrado (tubo derecho) en el cual se observa turbidez.

Medios selectivos

Los medios selectivos favorecen el desarrollo de un grupo bacteriano e inhiben el de otros por la incorporación de sustancias inhibitoras como sales, antimicrobianos y colorantes entre otros.

El medio agar cetrimide es selectivo para el aislamiento del género *Pseudomonas* spp., la selectividad la otorga el detergente catiónico cetrimide, que inhibe el desarrollo de las bacterias acompañantes.

Figura 5.8*Medio selectivo: Agar cetrimide*

Nota. a: Agar cetrimide. b: *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimide luego de 24 horas de incubación. c: *Pseudomonas aeruginosa* bajo luz ultravioleta, donde se observa la fluorescencia característica de esta especie bacteriana.

Medios diferenciales

Se define como medio de cultivo diferencial, aquel que permite diferenciar las bacterias que crecen en función a la utilización, o no, de algún sustrato que tenga adicionado. En general, también tienen un indicador de pH o reactivo que facilita la visualización.

En bacteriología clínica, el medio diferencial más utilizado es el CLDE (cisteína libre de electrolitos). Es útil para el aislamiento de la mayoría de las bacterias patógenas urinarias. La deficiencia de electrolitos impide el *swarming* de especies invasoras como *Proteus* spp. La diferenciación se basa en la utilización de lactosa por parte de las diferentes especies, y azul de bromotimol como indicador de pH (Figura 5.9).

Medios selectivos/diferenciales

Son medios que tienen adicionados componentes que permiten inhibir bacterias acompañantes y diferenciar las que crecieron en función de alguna propiedad bioquímica (Figura 5.10).

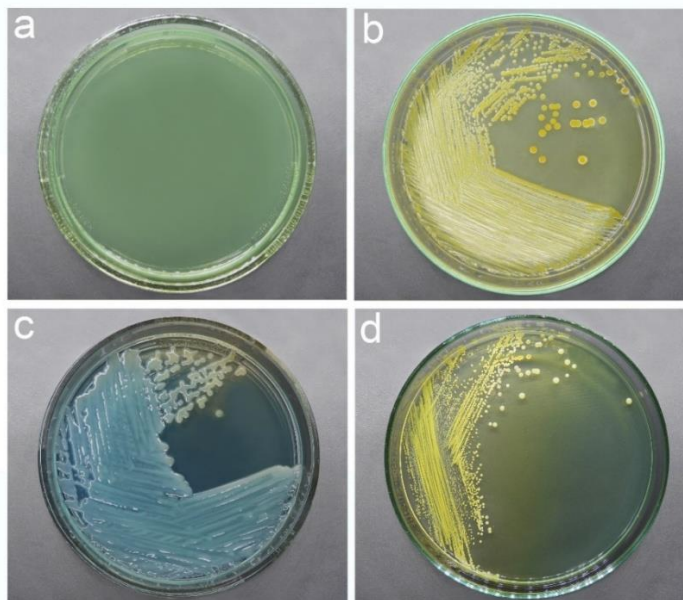
Agar Mac Conkey

Se utiliza para el aislamiento de enterobacterias. Dentro de sus componentes, las sales biliares y el cristal violeta son las sustancias inhibidoras. La lactosa, es el hidrato de carbono fermentable que permite diferenciar las bacterias en base a su utilización y el rojo neutro el indicador de pH. Las colonias de color fucsia indican que las bacterias fermentaron la lactosa. En los casos representados en las imágenes, *Escherichia coli* es lactosa positiva produciendo

colonias fucsias, mientras que *Salmonella* es lactosa negativa, por lo que sus colonias son incoloras.

Figura 5.9

Medio diferencial: CLDE



Nota. a: Medio CLDE. b: *Staphylococcus aureus* en CLDE luego de 24 horas de incubación. c: *Klebsiella pneumoniae* en CLDE luego de 24 horas de incubación. d: *Escherichia coli* en CLDE luego de 24 horas de incubación.

Figura 5.10

Medio selectivo y diferencial: Agar Mac Conkey



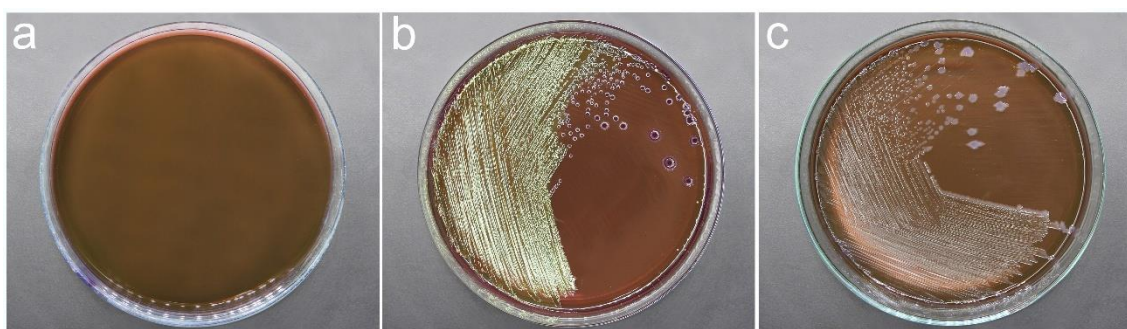
Nota. a: Agar Mac Conkey. b: *Escherichia coli* en agar Mac Conkey luego de 24 horas de incubación. c: *Salmonella* spp. en agar Mac Conkey luego de 24 horas de incubación.

Agar Eosina Azul de Metileno

Permite el desarrollo de enterobacterias. Los colorantes eosina y azul de metileno son las sustancias inhibidoras, mientras que la lactosa y sacarosa son los sustratos que le otorgan la característica diferencial. Las colonias de los grupos bacterianos que utilizan lactosa y sacarosa presentan un brillo verde metalizado característico, debido a la precipitación de los colorantes en pH ácido. Las bacterias que no los utilizan forman colonias rosas.

Figura 5.11

Medio selectivo y diferencial: Agar eosina azul de metileno (EMB)



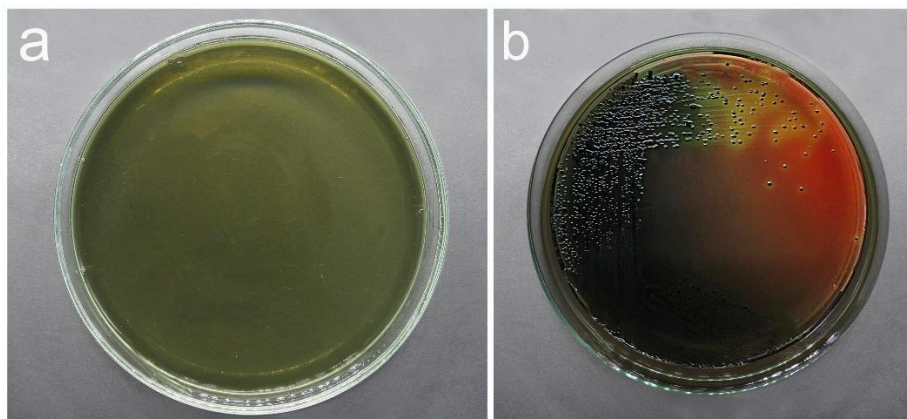
Nota. a: Agar EMB. b: *Escherichia coli* en EMB luego de 24 horas de incubación; c: *Salmonella* spp en EMB luego de 24 horas de incubación.

Agar Hektoen Entérico

El medio AHE, debido a la mayor concentración de sales biliares, es altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. La lactosa, sacarosa y salicina son los hidratos de carbono fermentables. El azul de bromotimol y la fucsina ácida son los indicadores de la fermentación de hidratos de carbono, mientras que el citrato de hierro actúa como indicador de la formación de SH_2 a partir del tiosulfato debido a que se forma sulfuro de hierro, compuesto de color negro.

Figura 5.12

Medio selectivo y diferencial: Agar Hektoen entérico



Nota. a: Agar Hektoen entérico (AHE). b: Desarrollo de diferentes géneros de enterobacterias. Las colonias verde-botella con centro negro y periferia verde, corresponden a *Salmonella* spp. luego de 24 horas de incubación;

Agar Manitol Salado

EL AMS se desarrolló para el aislamiento de *Staphylococcus*. La elevada concentración de cloruro de sodio se utiliza como agente selectivo, mientras que el manitol (hidrato de carbono) y el rojo de fenol (indicador de pH) son los componentes diferenciales del medio. La utilización del manitol se manifiesta por la acidificación del medio, el rojo de fenol vira al color amarillo (Figura 5.13b); en caso de no utilizar el manitol en su ruta metabólica pero sí, las peptonas, las colonias se observarán de color fucsia (Figura 5.13c).

Figura 5.13

Medio selectivo y diferencial: Agar manitol salado



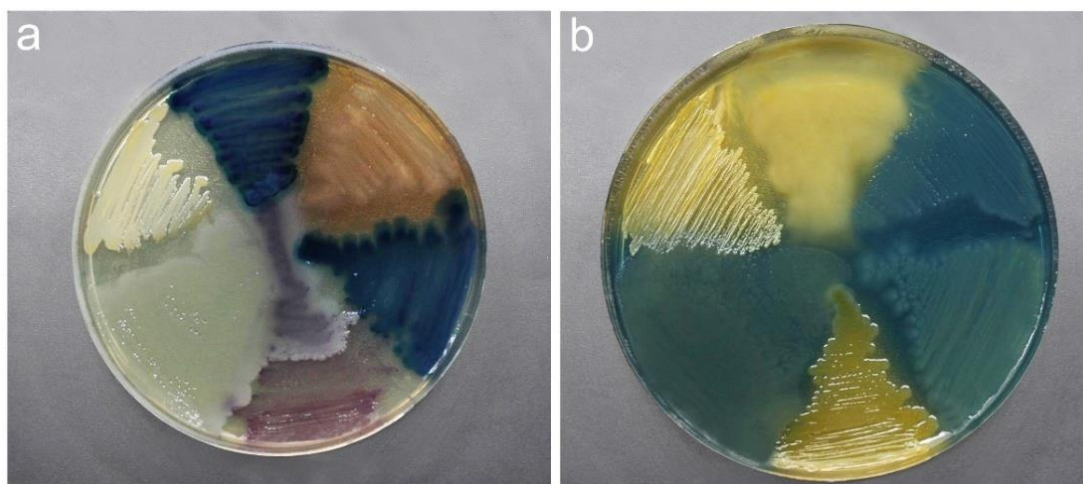
Nota. a: Agar manitol salado (AMS). b: *Staphylococcus aureus* en AMS luego de 24 horas de incubación. c: *Staphylococcus saprophyticus* en AMS luego de 24 horas de incubación.

Medios de cultivo cromogénicos

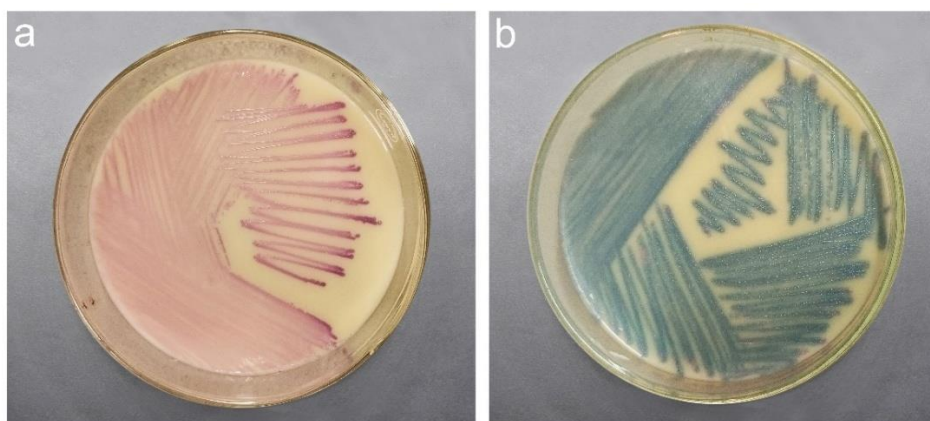
Los medios de cultivo cromogénicos, tienen incorporado dentro de sus componentes un sustrato cromogénico comercialmente sintetizado (o cromógeno) que permite la detección de diversas enzimas hidrolasas, como glicosidasas, peptidasas, fosfatasas y esterases. Este grupo de enzimas incluye varios productos génicos específicos para cierto género (o en algunos casos especie) de bacterias y su detección a menudo puede ser una ayuda invaluable para la diferenciación e identificación. Los principales beneficios de los medios cromogénicos sobre los convencionales son su sensibilidad y especificidad mejoradas. Pueden incluir más de un cromógeno. Por ejemplo, un medio que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indoxil β -D-glucopiranosida (X-Gluc) y 6-cloro-3-indoxil β -D-galactopiranosida (red-Gal), es útil para la diferenciación de potenciales patógenos del tracto urinario, que permiten diferencias especies bacterianas.

Figura 5.14

Medio cromogénico CHROMagar Orientation



Nota. Las bacterias β -galactosidasa +, escinden el sustrato red-Gal para producir colonias rosas/rojas (por ejemplo *E. coli*), mientras que la expresión de β -glucosidasa resulta en una escisión del X-Gluc para formar colonias verdes (por ejemplo, *Enterococcus* spp.). La expresión de ambas enzimas resulta en colonias de un azul-violeta oscuro y es indicativo de *Klebsiella*, *Enterobacter* o *Serratia* spp. (grupo KES). Estafilococos y estreptococos no producen ninguna de esas enzimas y crecen como colonias blancas o incoloras.

Figura 5.15*Medio cromogénico CHROMagar VRE*

Nota. a: *Enterococcus faecalis* en CHROMagar VRE. b: *Enterococcus gallinarum* en CHROMagar VRE.

Condiciones de incubación

El desarrollo bacteriano en un medio de cultivo no solo depende de los nutrientes disponibles, sino también de factores ambientales, como el tiempo de incubación, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno. Estas variables, agrupadas como **condiciones de incubación**, se establecen según los grupos bacterianos que se cultivan.

Tiempo de incubación

El tiempo de incubación⁵ está relacionado con la duplicación o generación bacteriana⁶. Debido a esta condición, las bacterias se agrupan en dos: de **crecimiento rápido**, lo hacen en menos de 7 días, y de **crecimiento lento**, más de 7 días.

Como concepto general, el tiempo de incubación de las bacterias de crecimiento rápido que **no son nutricionalmente exigentes**, enterobacterias, estafilococos, *Pseudomonas* spp., es de **24 horas** mientras que, para las que son **nutricionalmente exigentes**, estreptococos, familia *Pasteurellaceae*, es de **48 horas**.

⁵ Se define tiempo de incubación, como el tiempo necesario para observar desarrollo bacteriano, colonias (medio sólido) o población (medio líquido).

⁶ Es el tiempo que transcurre entre que una bacteria se divide para formar dos bacterias hijas. Puede variar de 20 minutos, en *Escherichia coli*, a 24 horas como en el caso de los géneros *Leptospira* y *Mycobacterium*.

Temperatura - Estufas de cultivo

La temperatura afecta a los organismos de dos formas opuestas. Cuando la temperatura sube, la velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta y el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de una temperatura determinada, las proteínas y otros componentes celulares pueden desnaturalizarse o dañarse irreversiblemente.

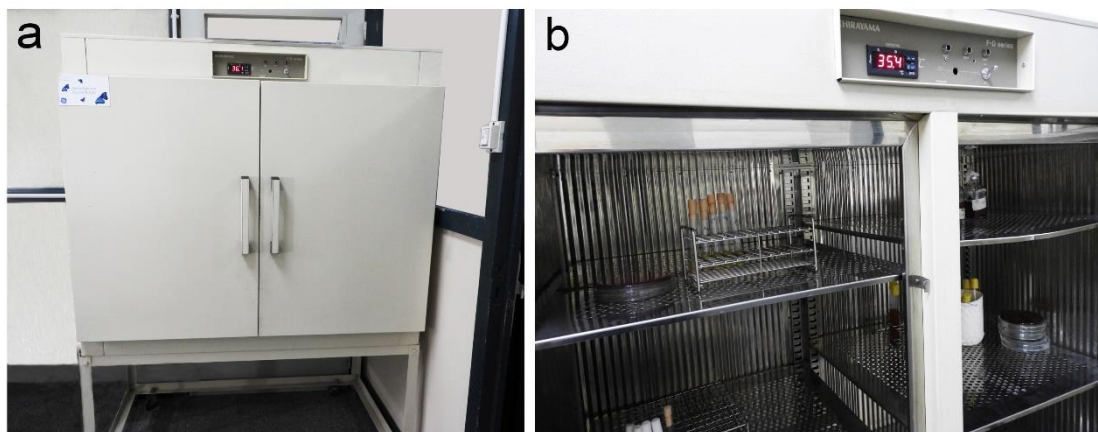
Para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no es posible el crecimiento, una temperatura óptima en la cual el crecimiento es más rápido, y una temperatura máxima por encima de la cual tampoco es posible el crecimiento.

En general, los principales patógenos son mesófilos y su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (± 2 °C).

En los laboratorios de microbiología, se utilizan las estufas de cultivo.

Figura 5.16

Estufa de cultivo



Nota. a-b: Estufa de incubación para microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y mesófilos.

Condición atmosférica

Para muchos microorganismos, el oxígeno (O₂) es un nutriente esencial; sin él no pueden llevarse a cabo el metabolismo ni el crecimiento. Otros organismos, por el contrario, no pueden crecer, e incluso pueden morir, en su presencia.

Según su relación con el O₂, las bacterias se agrupan en cinco:

- Aerobias estrictas, aerobias/anaerobias facultativas: no se requiere generar atmósferas (Figura 5.16).

- Microaerófilas: la tensión de O₂ atmosférico debe ser menor. Requieren generación de atmósfera.
- Anaerobias estrictas y aerotolerantes: el O₂ es letal. Requieren generación de atmósfera.

Para la generación de atmósferas microaerófila o anaerobia se utilizan métodos físicos como las jarras de intercambio de gases (Figura 5.17) o combinados como los que se observan en la Figura 5.18. En este último, la atmósfera requerida se genera por activación de diversas sustancias contenidas en los sobres.

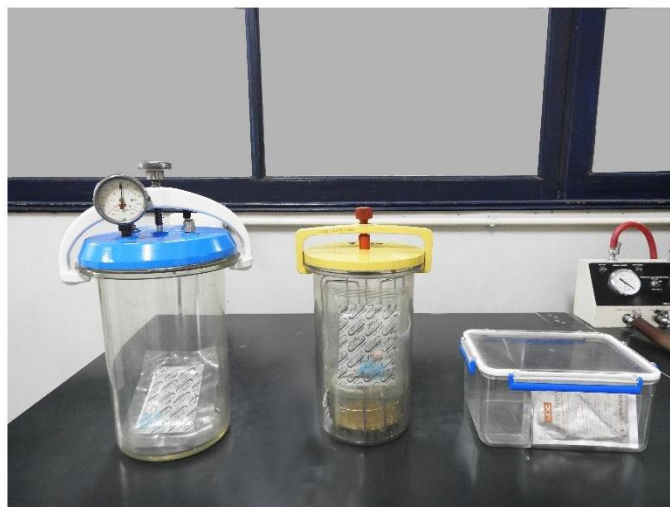
Figura 5.17

Estufas de cultivo con sistema de intercambio de gases para generación de diferentes atmósferas



Nota: a: Estufa de intercambio de gases. b: Interior de la estufa de intercambio de gases. c: Jarra en cuyo interior se colocan las placas de petri.

El éxito del aislamiento bacteriano depende en gran medida de brindarles a las bacterias las condiciones que requieren tanto nutricionales como ambientales, de lo contrario, se podrían obtener falsos resultados. Para lo cual, la comunicación entre el veterinario clínico y el bacteriólogo es fundamental, ya que permite comenzar la marcha bacteriológica a partir de un diagnóstico presuntivo acertado o, al menos, lo más cercano a la realidad.

Figura 5.18*Sistemas de generación de atmósferas anaeróbicas o microaerófilas*

Nota. En los sobres ocurre una reacción química que genera $H_2 + CO_2$. El H_2 reacciona con O_2 en la jarra para formar H_2O_2 sobre la superficie de un catalizador de paladio; la atmósfera final contiene N_2 , H_2 y CO_2 .

Aislamiento bacteriano

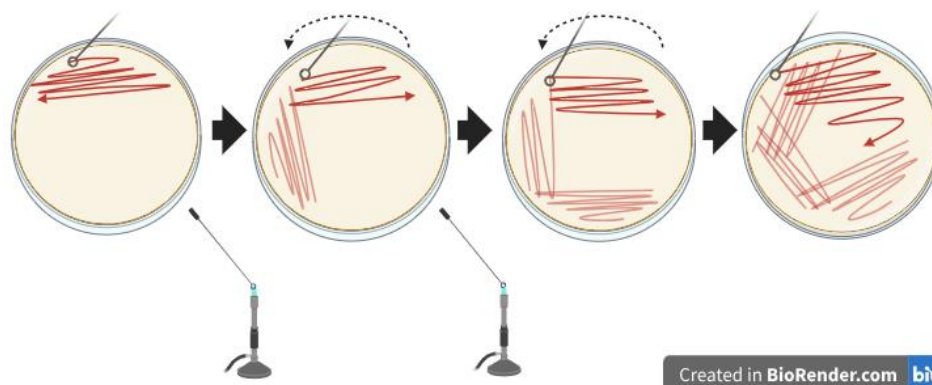
Desde el punto de vista de la clínica, es primordial la obtención de **cultivos bacterianos puros**, que permitan su posterior identificación y determinación del comportamiento frente a antimicrobianos con el fin de implementar una estrategia terapéutica conveniente.

El concepto de aislamiento bacteriano refiere al proceso que debe seguirse para la obtención de colonias “aisladas”, etapa requerida para lograr cultivos puros. La Figura 5.18 esquematiza los pasos de la técnica de aislamiento denominada por “agotamiento” o diseminación en una placa. Se coloca una ansada de la muestra clínica (materia fecal, orina, colecta de líquidos biológicos) en un extremo; en caso de que la muestra se transporte en un hisopo, hay que frotarlo sobre la superficie del agar, posteriormente, se gira en sentido contrario a las agujas del reloj, se arrastra material de la estría anterior, se disemina nuevamente y así sucesivamente hasta la cuarta estría; entre la primera y segunda estría, y la siguiente en caso de que la muestra esté cargada con mucho material, el ansa se esteriliza con fuego directo.

Si se utilizó ansa calibrada, capacidad 10 μ l, se presume que la cantidad aproximada de bacterias en la muestra inicial, de acuerdo al número de colonias en las 4 estrías, será 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 respectivamente.

Figura 5.19

Esquematzación de la técnica de siembra por agotamiento



Nota. En la secuencia de imágenes se observan las cuatro estrías que se realizan con la finalidad de obtener colonias aisladas.

Referencia

- Bautista E y Del Curto B.E. Cultivo de microorganismos. (2019). N.O. Stanchi y colaboradores (Ed. 2°). *Microbiología veterinaria* (pp. 84-101). Ed. Intermédica.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1999) Introducción a la Microbiología. En E.W. Koneman, S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn (Ed. 5°), *Diagnóstico microbiológico, texto y atlas color* (67 – 112). Editorial médica panamericana.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D. P. (2009). Crecimiento microbiano. En M.T. Madigan, J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark (Ed. 12°), *Brock. Biología de los microorganismos* (pp. 155-189). Pearson educación, S.A.
- Tórtora, G.J., Junke, B.R., Case, C.C. (2007). Crecimiento microbiano. En G.J. Tórtora, B.R. Junke, C.C. Case (Ed. 9°), *Introducción a la microbiología* (pp 159-186). Editorial Médica-Panamericana.

CAPÍTULO 6

Caracterización bioquímica y fisiológica de las bacterias

Eliana Andrea Lorenti y Hernán Darío Nieves

Una vez obtenidos los aislamientos bacterianos, es necesario realizar su caracterización fenotípica, a partir de un cultivo puro, con el fin de identificar taxonómicamente al agente en estudio. Se considera cultivo puro aquel que contiene un único microorganismo, derivado de una única célula, lo que da lugar a clones idénticos.

Para la identificación taxonómica, se emplean diferentes medios y sustratos que permiten evidenciar características metabólicas y bioquímicas de las bacterias. En general, para la identificación de grupos bacterianos con características morfológicas y tintoriales semejantes, se utiliza una batería de pruebas bioquímicas y fisiológicas determinada.

Dentro de las pruebas bioquímicas y fisiológicas se encuentran aquellas cuya lectura e interpretación se realizan en el momento y se agrupan como **pruebas de lectura rápida** y las que requieren de un tiempo de incubación para poder hacerlo, **pruebas de lectura lenta**. Las primeras, como son oxidasa y catalasa, proporcionan resultados de forma inmediata. En contraste, las pruebas lentas, como la fermentación de hidratos de carbono, la utilización de citrato de sodio y la producción de ácido sulfhídrico, requieren al menos 24 horas de incubación antes de su lectura e interpretación.

En este capítulo, se describen algunas de las pruebas bioquímicas y fisiológicas más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico bacteriológico. Si bien no son las únicas disponibles, forman parte del análisis rutinario y contribuyen a la identificación del agente bacteriano. En la mayoría de los casos permiten determinar la especie bacteriana, cuando esto no ocurre, es necesario recurrir a otro tipo de métodos como son las pruebas genotípicas o fenotípica espectrofotometría de masa (MALDI-TOF), que permiten separar e identificar macromoléculas según su masa molecular. Debido a la accesibilidad y costos que estos métodos conllevan, las pruebas bioquímicas y fisiológicas continúan siendo una herramienta de uso rutinario en los laboratorios de microbiología.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas de lectura rápida

Prueba de la oxidasa

La prueba de la oxidasa permite determinar la presencia de las enzimas oxidasas que intervienen en la cadena de transporte de electrones de las bacterias.

Técnica

Para la realización de la prueba se requiere un reactivo que será el sustrato de las enzimas oxidasas.

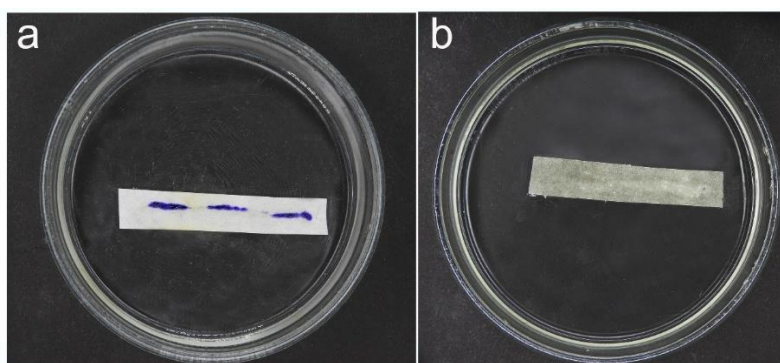
- Método indirecto con el reactivo de Kovacs sobre papel.
 - Colocar un papel de filtro de aproximadamente 6 cm² en una placa de petri.
 - Agregar entre 2 y 3 gotas del reactivo de Kovacs (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1 %) en el centro del papel.
 - Extender la colonia sospechosa en el papel impregnado con el reactivo, siguiendo una línea de 3 a 6 cm de longitud.
 - La reacción de color se produce de los 5 a 10 segundo.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: la colonia extendida sobre el papel toma color azul. La reacción positiva dentro de los 10 a 60 segundos se considera un resultado retardado.
- Prueba negativa: la colonia extendida sobre el papel no cambia de color.

Figura 6.1

Prueba de oxidasa



Nota. a: Prueba positiva. b: Prueba negativa.

Prueba de la catalasa

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de la enzima catalasa, la cual actúa en la desintegración de productos tóxicos del metabolismo bacteriano que se producen como consecuencia del metabolismo del O₂.

Técnica

Para la realización de la prueba de la catalasa de rutina, a temperatura ambiente, utilizando el método del portaobjetos, se recomienda,

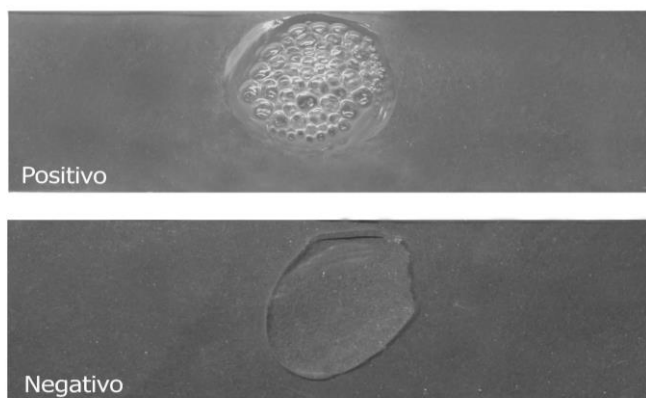
- Con ansa en aguja tomar el centro de una colonia bacteriana de 18 a 24 horas y colocarla sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Si el cultivo proviene de un medio con sangre, tener la precaución de no tocarlo ya que se podrá obtener falso resultado positivo.
- Agregar una gota de H₂O₂ al 30 % sobre las bacterias, utilizando un gotero o pipeta.
 - **No** invertir el orden del método porque pueden producirse falsos resultados positivos.
 - **No** mezclar con el ansa de inoculación ya que **no** es necesario.
- Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado.
- Descartar el portaobjetos dentro de un recipiente con desinfectante.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: formación inmediata de burbujas visibles (liberación de O₂).
- Prueba negativa: no hay formación de burbujas (no se libera O₂).

Figura 6.2

Prueba de la catalasa



Nota. Prueba positiva. Prueba negativa.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas de lectura lenta

Fermentación de hidratos de carbono

Se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio base, produciendo ácido o ácido con gas visible.

Técnica

- Medio base caldo rojo de fenol con el agregado del hidrato de carbono a probar en concentración del 1 %: glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, dulcitol, xilosa, arabinosa, entre otros. El rojo de fenol es un indicador que en pH neutro es naranja, pH ácido (6.8) vira el amarillo y en pH alcalino (8,2) al fucsia.
- Inoculación: es posible inocular una batería de hidratos de carbono con un inóculo espeso de un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), durante 18 a 24 horas, aunque puede ser necesaria una incubación más prolongada de hasta 30 días para considerar un resultado negativo, esto dependerá de la bacteria en estudio, en condición de aerobiosis.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: el medio se observa de color amarillo debido al descenso de pH.
- Prueba negativa: el medio se observa fucsia (aumento de pH x utilización de la peptona).

Figura 6.3

Fermentación de hidratos de carbono



Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1: prueba -; Tubo 2: prueba +.

Producción de ureasa

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de la enzima ureasa que desdobla la urea, formando dos moléculas de amoníaco.

Técnica

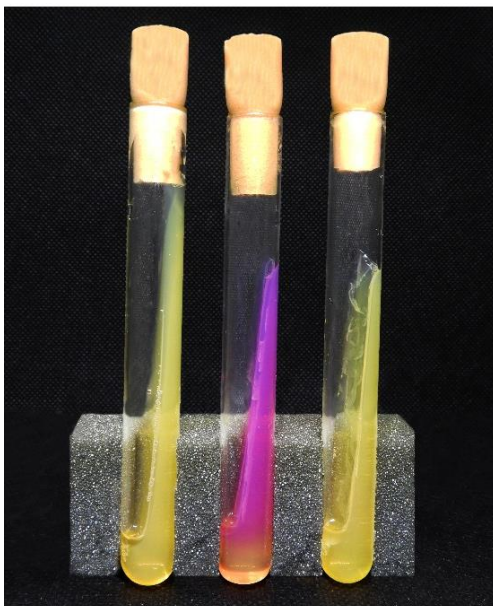
- Medio agar urea de Christensen (pH 6,8) con indicador de pH rojo de fenol, en posición oblicua.
- Inoculación: realizar la siembra de un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento, en cola de pescado, en el pico de flauta, no se hace punción de la capa profunda ya que sirve para control del color.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), durante 6 a 24 horas, y todos los días siguientes durante 6 días, en aerobiosis.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: color rojo rosado intenso en el pico de flauta, aunque puede penetrar en el agar.
- Prueba negativa: no se produce cambio de color.

Figura 6.4

Agar Urea de Christensen



Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1: urea agar base sin sembrar. Tubo 2: *Klebsiella pneumoniae* ureasa +. Tubo 3: *E. coli* ureasa -.

Utilización del citrato

Esta prueba se realiza para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar al citrato de sodio como única fuente de carbono.

Técnica

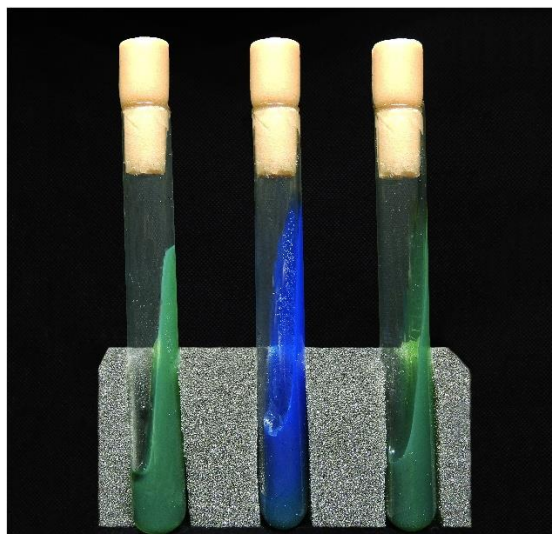
- Medio agar citrato de Simmons, que contiene citrato de sodio y sales de amonio. Una bacteria que es capaz de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono, utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. El medio se deja solidificar en posición oblicua. Tiene como con indicador al azul de bromotimol, verde a pH neutro, en pH ácido (6) vira al amarillo y en pH alcalino (7,6) al azul.
- Inoculación: realizar la siembra de un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento, en cola de pescado, en el pico de flauta.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C ($\pm$ 2), durante 24 a 48 horas; pudiendo requerir incubación prolongada (hasta 4 días), en aerobiosis.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: crecimiento con color azul intenso en el pico de flauta.
- Prueba negativa: no se observan crecimiento ni cambio de color.

Figura 6.5

Agar Citrato de Simmons



Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1: agar citrato de Simmons sin sembrar. Tubo 2: *Klebsiella pneumoniae* citrato +. Tubo 3: *Escherichia coli* citrato -.

Producción de decarboxilasas (lisina-ornitina-arginina)

Estas pruebas se utilizan para determinar la capacidad enzimática de las bacterias para decarboxilar un aminoácido.

Técnica

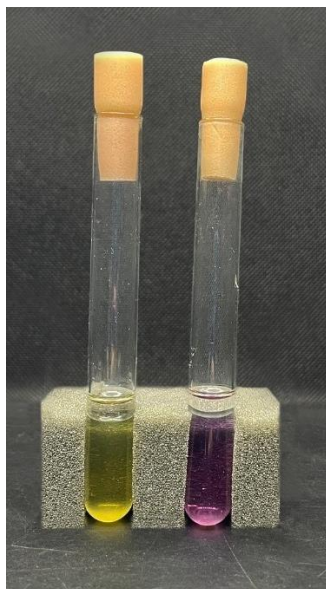
- Medio base de decarboxilasa de Möeller (pH 6) con el agregado del aminoácido a probar, L (+)-lisina, L (+)-ornitina, L (+)-arginina en concentración del 1 %. El medio contiene púrpura de bromocresol como indicador que en pH 6,2 es púrpura-violáceo y en pH ácido (5,2) vira al amarillo.
- Inoculación: con un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento, se siembra con inóculo liviano un tubo testigo sin aminoácido y el tubo con el aminoácido. Se cubren ambos tubos con 2 o 3 ml de parafina o vaselina estéril. En estas condiciones el oxígeno del medio es consumido por la bacteria y esto controla el pH.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C ($\pm$ 2), de 24 horas a 4 días con observaciones diarias.

Resultados – Interpretación

- Prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento (producido por la cadaverina).
- Prueba negativa: amarillo claro y brillante. Ocurre por la fermentación de la glucosa.

Figura 6.6

Medio Möeller base para descarboxilasas



Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1 testigo. Tubo 2 *Escherichia coli* lisina +.

Prueba del rojo de metilo y del Voges Proskauer

Estas dos pruebas tienen como finalidad determinar la vía metabólica que utilizan las bacterias para fermentar la glucosa. Con la de rojo de metilo (RM), se determina la capacidad de una bacteria de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Con la de Voges-Proskauer (VP), se determina la capacidad de algunas bacterias de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína).

La glucosa es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave de la glucólisis. A partir del ácido pirúvico una bacteria puede seguir varias vías. La prueba de RM se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno (pH) presente cuando una bacteria fermenta la glucosa. La concentración de hidrogeniones depende de la relación gaseosa (CO_2 y H_2), que, a su vez, es un índice de los diferentes ciclos del metabolismo de la glucosa. Las diferentes formas de fermentación se deben a variaciones en las enzimas vinculadas con el metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias RM positivas

producen alto volumen de ácidos: láctico, succínico, acético y fórmico; la descomposición del ácido fórmico es la llave para la producción de hidrógeno y anhídrido carbónico.

La prueba de VP se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. La producción de acetoína es uno de los ciclos de degradación.

Técnica

- Medio Caldo RM/VP o Clarks y Lubs (pH 6,9).
- Inoculación: con un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento, se siembra con inóculo denso.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), de 2 a 5 días, en aerobiosis.
- RM se revela con el indicador de pH rojo de metilo agregando una alícuota al tubo con el crecimiento bacteriano.
- VP se revela con el reactivo de Barrit que tiene 2 soluciones: la A es el α -naftol al 5 % que actúa intensificando el color; la solución B es una base fuerte como HOK al 40 %. Al tubo de caldo RM/VP con el cultivo bacteriano destinado para esta determinación, se colocan 0,6 ml de la solución A y 0,2 ml de la solución B. Se agita el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoína y obtener una reacción de color. Se deja reposar durante 10 o 15 minutos.

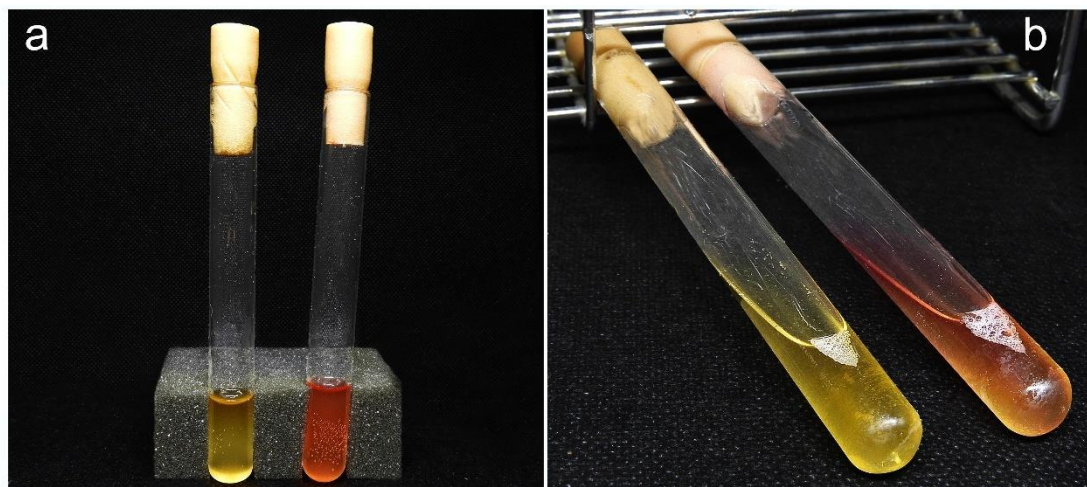
Resultados – Interpretación

RM

- Prueba positiva: el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el indicador de pH mantenga un definido color rojo (pH 4,4) en la superficie del medio.
- Prueba negativa: el indicador de pH vira al amarillo (pH 6) en la superficie del medio.

VP

- Prueba positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína).
- Prueba negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa.

Figura 6.7*Rojo de Metilo y Voges-Proskauer (MR-VP medio)*

Nota. a: Rojo de metilo: tubo izquierdo prueba -, tubo derecho prueba +. b: VP: tubo izquierdo prueba -, tubo derecho prueba +.

Medios de cultivo combinados

Los medios combinados tienen la ventaja de poder realizar con ellos varias determinaciones bioquímicas. Los que se tratarán en este capítulo se seleccionaron debido a lo cotidiano de su utilización.

Agar hierro de Kliger (AHK) o Agar hierro triple azúcar (TSI)

El AHK y el TSI son medios diferenciales en tubo que sirven a un doble fin, determinar la fermentación de hidratos de carbono y determinar la producción de ácido sulfhídrico.

- Determinación de las fermentaciones de los hidratos de carbono,
 - AHK: glucosa al 0,1 % y lactosa al 1 %. Indicador de pH rojo de fenol.
 - TSI: glucosa al 0,1 %, lactosa al 1 % y sacarosa al 1 %. Mismo indicador.
- Determinación de la producción de ácido sulfhídrico.
 - Ambos medios tienen los mismos sustratos: citrato férrico de amonio y tiosulfato de sodio.
- Medio AHK o TSI. En pico de flauta con fondo profundo.
- Inoculación: con ansa en aguja, se toma del centro de una colonia única y se siembra el medio por punción central en el fondo y en cola de pescado en el pico de flauta.

- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), de 18 a 24 horas, ni antes ni después, en aerobiosis.

Resultados – Interpretación

- Utilización de los hidratos de carbono

Se han observado tres formas básicas de fermentación: fermentación solo de la glucosa, fermentación de la glucosa y de la lactosa y no fermentación de glucosa ni lactosa.

- Fermentación de la glucosa: pico de flauta alcalino (fucsia) y fondo del tubo ácido (amarillo). Estas bacterias solo fermentan la glucosa, pero no la lactosa (Figura 6.3 tubo 2). El pico de flauta es alcalino, lo que indica que luego de la degradación aeróbica de la glucosa, las bacterias utilizaron las peptonas, cuyo catabolismo liberó amoníaco y el pH se alcalinizó.
- Fermentación de la lactosa y la glucosa: pico de flauta y fondo ácidos (todo el tubo amarillo). Se produjo la fermentación de la lactosa y de la glucosa con producción de gas (Figura 6.3 tubo 5).
- No fermentación de la lactosa ni de la glucosa: hay bacterias que no pueden fermentar la lactosa y la glucosa. Al ser incapaces de obtener nutrientes a partir de los hidratos de carbono, lo pueden hacer de forma aeróbica o anaeróbica a partir de las peptonas. Un pico de flauta y un fondo alcalinos degrada la peptona bajo ambas condiciones. Pico de flauta alcalino y fondo sin cambio, es una bacteria que solo puede catabolizar la peptona en condición aeróbica.

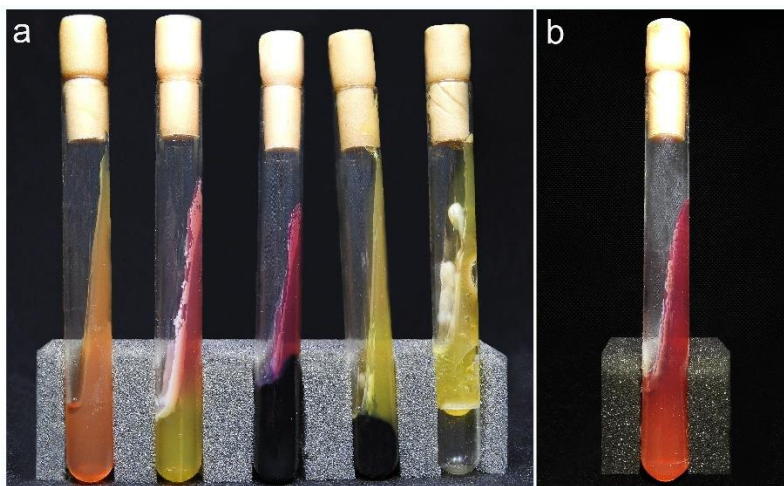
- Producción de ácido sulfhídrico (SH₂)

Algunas bacterias liberan SH₂ por acción enzimática sobre aminoácidos azufrados produciendo una reacción visible de color negro. La reacción se produce en dos etapas: en la 1° la bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción en medio ácido liberando gas SH₂. En la 2°, el SH₂ se combina con iones férricos formando sulfuro ferroso (precipitado negro).

- Prueba positiva: precipitado negro en el fondo del tubo.
- Prueba negativa: no se observa el precipitado negro.

Figura 6.8

Medio TSI (por su sigla en inglés Triple Sugar Iron Agar)



Nota. a (de izquierda a derecha): tubo 1: TSI sin sembrar. Tubo 2: *Shigella* spp. solo fermentó la glucosa. Tubo 3: *Salmonella* spp. fermentó la glucosa y produjo SH_2 . Tubo 4: *Citrobacter freundii* fermentó la lactosa y la glucosa y produjo SH_2 . Tubo 5: *E. coli* fermentó la lactosa y la glucosa con formación de gas. b: *Pseudomonas aeruginosa*, no fermentó la glucosa ni la lactosa.

Medio SIM

SIM es la sigla del medio semisólido utilizado en bacteriología para determinar dos propiedades bioquímicas, producción de ácido sulfhídrico y de indol y la **movilidad**.

- Determinación de la producción de ácido sulfhídrico.
El medio tiene los mismos sustratos que el TSI: citrato férrico de amonio y tiosulfato de sodio.
- Determinación de la producción de indol.
El indol es uno de los tres metabolitos indólicos que algunas bacterias pueden formar a partir de la oxidación del triptófano mediante un complejo de enzimas denominadas triptofanasa. El medio SIM, dentro de sus componentes, tiene tripteína y peptona como fuente de nutrientes. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína.
- Movilidad.
El agar, agente solidificante, esta adicionado a una concentración baja, 0,35 %, otorgándole al medio la particularidad de ser semiblando, lo que permite que las bacterias flageladas puedan moverse.

- Inoculación: del centro de una colonia única de un cultivo fresco de 18 - 24 horas de incubación, por punción profunda utilizando ansa aguja, inocular el centro del tubo. La punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), de 18 a 24 horas en aerobiosis.

Resultados – Interpretación

- Producción de ácido sulfhídrico (SH₂).

Algunas bacterias liberan SH₂ por acción enzimática sobre aminoácidos azufrados produciendo una reacción visible de color negro. La reacción se produce en dos etapas: en la 1°, la bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción en medio ácido liberando gas SH₂. En la 2°, el SH₂ se combina con iones férricos formando sulfuro ferroso (precipitado negro).

 - Prueba positiva: precipitado negro en el fondo del tubo.
 - Prueba negativa: no se observa el precipitado negro.
- Producción de indol.

La producción de indol se revela con la adición de 3 a 5 gotas del reactivo de Ehrlich o de Kovac's. Ambos contienen *p*-dimetilamino-benzaldehído, una fase alcohólica (es la diferencia entre ambos) y HCl concentrado. Cuando hay indol, este se combina con el aldehído que se encuentra en ambos reactivos, para dar color fucsia en la capa de alcohol. Esta reacción se produce por un proceso de condensación formado por el desdoblamiento ácido de la proteína.

 - Prueba positiva: el reactivo se adquiere color fucsia-rojo.
 - Prueba negativa: el reactivo mantiene su color amarillo claro.
- Movilidad
 - Prueba positiva: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
 - Prueba negativa: crecimiento solamente en la línea de siembra.

Figura 6.9*Medio SIM*

Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1: medio SIM sin sembrar. Tubo 2: *E. coli* indol y movilidad +. Tubo 3: *Klebsiella pneumoniae* indol y movilidad -. Tubo 4: *Salmonella* spp. producción de SH₂ + e indol -.

Lisina Hierro Agar

Lisina hierro agar (LIA) es un medio de cultivo diferencial en tubo desarrollado para diferenciar bacterias capaces de descarboxilar, o desaminar, la lisina y producir ácido sulfhídrico.

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano.

- Determinación de la descarboxilación, o desaminación, de la lisina.
El medio de cultivo contiene glucosa, como hidrato de carbono fermentable y la lisina que es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa o desaminasa. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH (color amarillo a pH igual o menor a 5,2 y púrpura a pH igual o mayor a 6,8).
- Determinación de la producción de ácido sulfhídrico.
El citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio son los sustratos incorporados en el medio para determinar la producción de ácido sulfhídrico.
- Inoculación: a partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio y mediante el uso de ansa en aguja, inocular picando hasta el fondo y en espina de pescado sobre el pico de flauta.
- Incubación: las condiciones son a 35 °C (± 2), de 18 a 24 horas en aerobiosis.
-

Resultados – Interpretación

- Determinación de la descarboxilación, o desaminación, de la lisina.
 - Prueba positiva: las bacterias fermentadoras de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje del color púrpura al amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad enzimática **descarboxilasa** y se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH y tornándolo al **color púrpura o violeta**.
 - Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella*, **desaminan** la lisina. Esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un **color rojizo** en la superficie del medio.
 - Prueba negativa: las bacterias fermentadoras de glucosa que no tienen actividad lisina descarboxilasa producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo color amarillo y la superficie de color violeta debido al consumo de las peptonas que producen alcalinidad.
- Producción de ácido sulfhídrico (SH₂).
 - Prueba positiva: precipitado negro en el fondo del tubo.
 - Prueba negativa: no se observa el precipitado negro.

Figura 6.10

Agar lisina hierro



Nota. De izquierda a derecha. Tubo 1: LIA sin sembrar.

Tubo 2: *E. coli* lisina descarboxilasa +. Tubo 3: *Salmonella* spp. lisina descarboxilasa y producción de SH₂ +. Tubo 4:

Proteus spp. color rojizo por la desaminación de la lisina.

Tubo 5: *Citrobacter koseri* lisina descarboxilasa -.

Referencias

- Mac Faddin. (1980). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Panamericana.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D. P. (2009). Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano. En M.T. Madigan, J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark (Ed. 12°), *Brock. Biología de los microorganismos* (pp. 117-153). Pearson educación, S.A.
- Tórtora, G.J., Junke, B.R., Case, C.C. (2007). Metabolismo microbiano. En G.J. Tórtora, B.R. Junke, C.C. Case (Ed. 9°), *Introducción a la microbiología* (pp 115-158). Editorial Médica-Panamericana.

SEGUNDA PARTE

Procesamiento de muestras clínicas Bacteriología General

CAPÍTULO 7

Coprocultivo

Fabiana Alicia Moredo

En perros y gatos, la amplia gama de enteropatógenos, potenciales y reconocidos, y la exigencia de brindar un informe rápido y preciso, refuerzan la necesidad de ser criteriosos en el momento de realizar el diagnóstico bacteriológico de una infección intestinal.

Las evaluaciones clínicas y epidemiológicas exhaustivas deben definir la gravedad y el tipo de enfermedad (fiebre, características de la diarrea, infección, leucograma inflamatorio). Se debe determinar si existen factores de riesgo como edad, contacto con otros animales enfermos, uso reciente de antibióticos, inmunosupresión. Esta información es necesaria para llevar adelante el cultivo bacteriológico de la materia fecal, coprocultivo, y la optimización de la terapia antimicrobiana.

Aunque los coprocultivos se solicitan con frecuencia para individuos con diarrea, su utilidad es cuestionada y el rendimiento diagnóstico, a menudo, se piensa que es bastante bajo debido a la relativa sensibilidad de las pruebas para los patógenos más probables y la mala selección de muestras que se remiten para su cultivo.

Si bien en la República Argentina aún no están disponibles, los paneles de PCR en tiempo real para diagnóstico de diarreas de perros y gatos proporcionan un nuevo paradigma en la detección rápida y sensible de genes que codifican toxinas u de microorganismos asociados con la enfermedad. Sin embargo, su interpretación puede ser problemática, debido a que, en la mayoría de los casos las bacterias que se detectan se encuentran con frecuencia en la materia fecal de perros y gatos clínicamente sanos.

Para los fines de este libro, se destacarán como enteropatógenos bacterianos de perros y gatos a *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Escherichia coli* diarreigénicas, *Clostridium perfringens* y *Clostridioides difficile*. En la actualidad, los métodos disponibles para detectar estos microorganismos carecen de sensibilidad y, en algunos casos, de especificidad. Además, el problema de determinar las etiologías en casos de gastroenteritis asociada a bacterias se ve magnificado por los desafíos de definir exactamente qué constituye un patógeno. Muchas cepas de *Campylobacter* spp. no *jejuni*, *C. difficile*, *C. perfringens* y *E. coli* pueden excretarse en ausencia de diarrea.

Cultivo de materia fecal - Coprocultivo

Se define como coprocultivo al cultivo de la materia fecal y se realiza con la finalidad de diagnosticar diarreas infecciosas de origen bacteriano. Consiste en tomar una porción de heces recién emitida y procesarla de forma inmediata. De no ser posible hacerlo, se remitirá al laboratorio de bacteriología un hisopo estéril en medio de transporte.

Este estudio se indica en aquellos casos donde debe implementarse una terapia antimicrobiana.

Tipos de muestras y recolección

Para la realización de coprocultivo, la muestra ideal es materia fecal fresca, recolectada en frasco de boca ancha estéril, o bien, en caso de estar presentes, tocar zonas purulentas o sanguinolentas con hisopo estéril, que posteriormente se debe introducir en un tubo con medio de transporte Cary-Blair⁷. Bajo estas condiciones, la muestra puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 5 días después de recogida.

En caso de recolectarse las heces frescas, la muestra se deberá remitir inmediatamente al laboratorio y procesarse, preferentemente, antes de las dos horas.

Otro tipo de muestra, aunque menos recomendada para la recuperación de algunos patógenos como *Salmonella*, es el hisopado rectal. La toma se realiza introduciendo un hisopo estéril lubricado con el medio de transporte en el recto del paciente, luego se coloca en el tubo con el Cary-Blair. De este modo, se podrá realizar la maniobra sin dificultad y se evitará la desecación de la muestra.

Las muestras como moco intestinal, pseudomembranas, entre otras, también se deben colocar en un tubo con el medio Cary-Blair.

Si se sospecha que la diarrea es ocasionada por bacterias anaeróbicas, la materia fecal debe transportarse en caldo tioglicolato de sodio.

Observación directa de la muestra

Debido a la gran diversidad de microorganismos que forman parte de la microbiota normal del intestino, la observación microscópica directa de la muestra (OMD) con tinción Gram, no es de gran aporte. La observación en fresco con azul de metileno o mediante una coloración simple

⁷ El medio de transporte Cary-Blair fue desarrollado para la recuperación de patógenos entéricos. Tiene un mínimo aporte de nutrientes que permite la recuperación de los microorganismos sin que haya replicación. El tioglicolato de sodio se incluye para proveer un bajo potencial de oxidoreducción y el pH relativamente alto minimiza la destrucción bacteriana por acidificación. Mantiene la viabilidad de patógenos entéricos.

como Giemsa, se podrían utilizar para determinar la presencia de leucocitos (reacción inflamatoria), eritrocitos (sangrado), hongos y parásitos.

Observación macroscópica y registro

El análisis de la materia fecal comienza con la observación y registro de sus características como son:

- consistencia (formada, no formada (blanda) o líquida).
- color (blanco, amarillo, marrón o negro).
- la presencia de componentes anormales (mucus o sangre).

Técnica de observación en fresco con azul de metileno

- a. Colocar una pequeña gota de materia fecal o del hisopado rectal junto con el mucus (si está presente) en una gota de solución de azul de metileno al 0,05 % sobre un portaobjetos limpio y homogeneizar.
- b. Colocar un cubreobjetos sobre la suspensión teñida, evitando la formación de burbujas de aire. Aguardar de 2 a 3 minutos. Examinar con microscopio óptico utilizando el objetivo de menor aumento (10 X).

Registrar presencia de células que puedan identificarse claramente como leucocitos mononucleares o polimorfonucleares; ignorar las células cuya morfología se observe alterada.

La información que se puede obtener con la OMD de la materia fecal diarreica puede dar una indicación del organismo involucrado:

- En la salmonelosis y la infección por presencia de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), se pueden observar < 20 polimorfonucleares por campo. En diarreas producidas por *Campylobacter* spp podrían observarse leucocitos y eritrocitos.
- En diarrea producida por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógenas (EPEC), o de origen viral, la cantidad de leucocitos es mucho menor, 2–5 células por campo.

Enriquecimiento - Cultivo

El cultivo de la muestra depende del enteropatógeno del cual se sospecha, teniendo que considerarse: requerimientos nutricionales, factores ambientales como temperatura, disponibilidad de oxígeno, tiempo de generación.

El enriquecimiento de la muestra se utiliza habitualmente para el aislamiento de *Salmonella* spp. y *E. coli* diarraigénicas (DEC) a partir de materia fecal. No es necesario para *Campylobacter* spp. ni *C. difficile* o *C. perfringens*.

Preparación y siembra de la muestra

Consideraciones generales,

- Preparar una suspensión fecal con aproximadamente un 1 gramo de heces y 1 ml de solución salina estéril (si la muestra es líquida, no es necesario hacerlo). Los hisopados rectales frescos o en medio Cary-Blair deben enjuagarse completamente en 1 ml de solución salina estéril.
- Aislamiento de *Campylobacter* spp. existen varios medios selectivos (Blaser, Butzler, Skirrow) que contienen diferentes suplementos antimicrobianos. Se puede utilizar una base de agar sangre con 5 - 10 % de sangre ovina, cefalosporina (15 mg/ml), vancomicina (10 mg/ml), anfotericina B (2 mg/ml) y 0,05 % de sulfato de hierro-metabisulfito de sodio-piruvato de sodio (FBP). Dada la relación de las campilobacterias con el oxígeno, es un requerimiento la generación de una atmósfera microaerófila (5 % de O₂, 10 % de CO₂ y 85 % de N₂). Otra característica de este grupo bacteriano es que algunas especies son termotolerantes, por lo cual la temperatura de incubación será a 42 – 43 °C. Si se investigan especies no termotolerantes, debe ser a 35 – 37 °C.
- Aislamiento de enterobacteriales, sembrar tres o más ansadas de la suspensión fecal en el caldo de enriquecimiento, si se busca *Salmonella* o DEC el recomendado es agua peptonada *bufferada* (APB). Las condiciones de incubación para enterobacterias son a 37 °C durante 18 horas en atmósfera aeróbica.
 - Repique en medio selectivo/diferencial
 - En la marcha bacteriológica para el aislamiento de *Salmonella* se realiza un paso intermedio y, desde el APB, se replica a medios de enriquecimiento selectivo (Caldo tetrationato, caldo Rappaport-Vassiliadis), luego a los medios sólidos agar Hecktoen entérico y agar XLD.
 - Medios de cultivo selectivos diferenciales para enterobacterias: Agar Mac Conkey, EMB. Se utilizan para la búsqueda de *Enterobacterales* y *Escherichia coli*, en particular bajo las mismas condiciones de incubación.
- Aislamiento de bacterias anaeróbicas, géneros *Clostridium* o *Clostridioides*, Agar sangre con incubación en condición de anaerobiosis (con generadores comercial de anaerobiosis o intercambio de gases) a 37° C durante 24 o 48 horas respectivamente. Para optimizar el aislamiento e identificación de *C. difficile* se dispone de medios de cultivo cromogénicos.

Marchas bacteriológicas para los grupo de enteropatógenos de importancia

Enterobacterales

El orden *Enterobacterales* está integrado por las familias *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* y *Yersiniaceae*, entre otras.

Los géneros bacterianos pertenecientes a este orden se caracterizan por ser bacilos gramnegativos no esporulados, alguno de ellos móviles, con o sin cápsula. En general no tienen requerimientos nutricionales, por tal motivo crecen en medios de cultivo simple. Son aerobios-anaerobios facultativos, de crecimiento rápido. Utilizan los hidratos de carbono por la vía fermentativa. Producen ácido y gas por fermentación de la glucosa. Producen catalasa. Son oxidasa negativos. Son llamadas enterobacterias porque habitan frecuentemente en el tracto digestivo animal y humano, aunque hay especies que pueden encontrarse en tierra y agua.

Escherichia coli diarreigénicas

Escherichia coli es la especie tipo del género y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. En la actualidad se reconocen 6 patotipos de *E. coli* diarreigénicas (DEC), y cada uno de ellos se define por la presencia de un conjunto de factores de virulencia adquiridos a través de la transferencia horizontal de genes que actúan de tal forma que otorgan características clínicas, patológicas y epidemiológicas de la enfermedad que causan: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherencia-difusa (DAEC). Los perros y en menor medida los gatos, son portadoras de genes virulencia de DEC, principalmente EPEC y EAEC. Diversos trabajos de investigación reportan la detección de estos genes en aislamientos de animales sin diarrea, lo que sugiere que las mascotas pueden actuar como reservorio de la infección humana. Hasta el momento, no está completamente definido el rol de los diversos patotipos de DEC como agente infeccioso de en estos animales.

ETEC se asocia a cuadros de diarreas acuosa o mucosa, con mayor frecuencia en perros jóvenes.

STEC, productora del síndrome urémico hemolítico en humanos, se relacionó a síndromes similares en caninos. La enfermedad renal aguda puede estar asociada a lesiones vasculares cutáneas (que son ulcerativas y se presentan en miembros posteriores); se observó en Greyhound que eran alimentados con carne cruda. Posteriormente, se hipotetizó que era producido por la acción de las toxinas Shiga. También se describió en otras razas, observándose lesiones vasculares cutáneas sin falla renal.

EIEC se asocia a colitis granulomatosa del Bóxer (y con menor frecuencia, en Bulldog francés y Border collie, entre otras razas). Esta infección, generalmente, afecta a perros jóvenes que muestran signos de colitis severa (engrosamiento y ulceración del colon) con pérdida de

peso. La fisiopatogenia no se encuentra completamente dilucidada, pero existiría un proceso inflamatorio crónico con pérdida de la integridad de la barrera entérica, favoreciendo la invasión y la colonización de esta bacteria.

Considerando que la presencia de *E. coli* en materia fecal es habitual ya que forma parte de la microbiota comensal, el desafío en el laboratorio de bacteriología veterinario es identificar los aislamientos obtenidos a nivel de patotipos. En la actualidad, la metodología recomendada es la detección de los genes que codifican los factores de virulencia que caracterizan a cada uno de ellos.

Diagnóstico de diarrea por *E. coli*

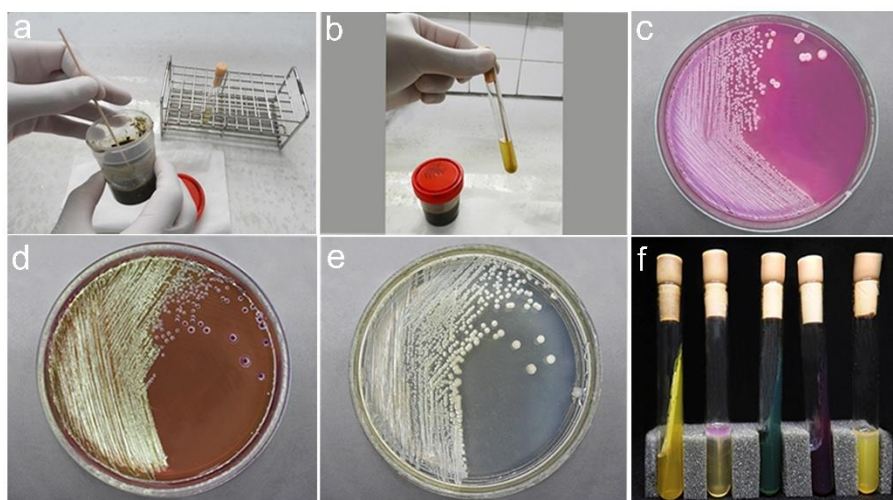
El diagnóstico de diarrea ocasionada por *E. coli* diarreigénicas se puede realizar con diversos protocolos. Sea cual fuere, lo importante es concluir que el aislamiento de *E. coli* obtenido es portador de los genes de virulencia que caracterizan al patotipo involucrado.

En general, el procedimiento a seguir depende de la posibilidad que tengan los laboratorios. A modo de ejemplo, si cuentan con equipamiento para la realización de técnicas moleculares como PCR, la materia fecal se sembrará en agar MacConkey, posteriormente se hará un *pool* de 10 colonias aisladas y, PCR mediante, se determinará la presencia de los genes de virulencia de ECD. Si el *pool* resulta positivo a alguno de ellos, se hará PCR de colonia aislada.

Si el laboratorio no cuenta con el equipamiento, lo ideal es sembrar la materia fecal en agar EMB y derivar el cultivo a uno que pueda realizar la detección de ECD.

Figura 7.1

Aislamiento de Escherichia coli a partir de materia fecal de un perro con diarrea



Nota. a y b: preparación de la materia fecal para su siembra. c y d: desarrollo de colonias sospechosas de *E. coli* en agar MacConkey y en agar EMB. e: colonias de *E. coli* en ATS. f: batería de pruebas de identificación bioquímica y fisiológica de *E. coli* (TSI, SIM, citrato, LIA y Agar urea de Christensen).

Salmonella

Salmonella spp. es otro de los géneros que integran la familia *Enterobacteriaceae*, que produce enfermedad tanto en animales como en humanos. La transmisión ocurre, principalmente, por la ingesta de agua y/o alimentos contaminados. Si bien son cinco las especies que integran el género, *S. enterica* es la que presenta mayor virulencia y agrupa seis subespecies que incluyen aproximadamente 2500 serovares. La serotipificación se realiza según el esquema Kauffmann-White-Le Minor en base en los antígenos somáticos O (cadena lateral O del LPS) y flagelares H. Se debe considerar que esta bacteria no forma parte de la microbiota intestinal de perros y gatos.

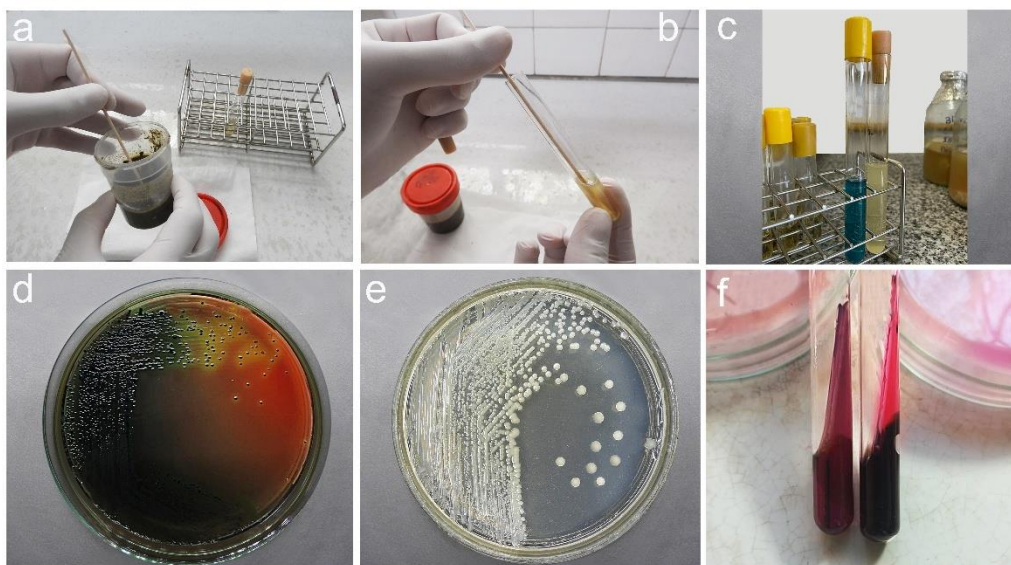
Luego del ingreso, *Salmonella* sobrevive a la acción de los jugos gástricos e invade, en el intestino delgado, los enterocitos, las células M y las células dendríticas. La localización en los linfonódulos mesentéricos permite que evada la respuesta inmune y pueda ser eliminada, a través de las heces, por semanas e incluso meses. Si bien algunos perros pueden presentar enterocolitis e inclusive, enfermedad sistémica, en la mayoría de los casos cursa de forma asintomática. Dentro de las manifestaciones clínicas se describe decaimiento, pérdida de peso, fiebre, anorexia, diarreas acuosas que alternan con hemorrágicas, dolor abdominal y vómitos. Las diarreas pueden requerir semanas para su resolución. De forma poco frecuente, pueden observarse signos clínicos extraintestinales y se debe a la colonización de diversos órganos.

Diagnóstico de salmonelosis

Para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de la salmonelosis, se recomienda la utilización de la norma ISO 6579-1:2017 y la serotipificación con el esquema de White-Kuffmann-Le Minor mediante aglutinación en portaobjetos (antígeno O) y en tubo (antígeno H), utilizando antiseros específicos (Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB) - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Argentina).

Figura 7.2

Aislamiento de Salmonella a partir de materia fecal de un perro con diarrea



Nota. a y b: preparación de la materia fecal para su siembra. c caldos de enriquecimiento selectivo. d: desarrollo de colonias sospechosas de *Salmonella* en agar Hecktoen entérico (verde botella con centro negro). e: colonias de *Salmonella* en ATS. f: pruebas básicas de identificación bioquímica de *Salmonella* (LIA y TSI).

***Campylobacter* spp**

El género *Campylobacter* integra la familia *Campylobacteraceae* y agrupa aproximadamente a 30 especies y subespecies, entre las que se destacan *C. jejuni* y *C. coli* que se aíslan de animales y seres humanos con diarrea. Otras campilobacterias intestinales catalasa-negativas, como *C. upsaliensis*, *C. helveticus* y *C. lari*, se recuperan con mayor frecuencia de perros y gatos asintomáticos y con diarrea. Análisis genéticos indican que los perros pueden estar colonizados con *C. felis* y *C. showae*, entre otras especies. Además del aislamiento de múltiples especies de campilobacterias, también puede existir heterogeneidad genética intraespecie.

Las campilobacterias son bacterias gramnegativas delgadas, con forma de S, coma o espiral y móviles por la presencia de flagelos polares que le permiten un movimiento característico tipo dardo. Son microaerófilos estrictos. En cultivos de varios días (más de tres), degeneran en formas esféricas u ovoides no viables.

Las formas de transmisión son el contacto directo entre animales, con heces infectadas (en forma directa o indirecta) y el consumo de carne cruda o mal cocida. La carcaza y las vísceras del pollo pueden considerarse como una de las principales fuentes de infección, ya que las aves domésticas actúan como reservorio de *C. jejuni*. Es probable que una pequeña proporción de los casos humanos de campilobacteriosis se adquieran por contacto con mascotas. Existen diversos estudios que evidencian la eliminación asintomática, pero intermitente y prolongada,

de este patógeno en perros jóvenes. En estos casos, la dieta con productos cárnicos crudos sería un factor de riesgo.

Campylobacter coloniza el tracto intestinal, yeyuno, íleon y colon. A diferencia de otras bacterias enteropatógenas, posee relativamente pocos factores de virulencia, siendo los factores del hospedador los que determinan la gravedad de los signos clínicos. Generalmente son la diarrea acuosa, que puede alternar con cuadros de diarrea mucoide y/o hemorrágica, asociadas o no, a decaimiento, dolor abdominal, pérdida de peso y en menor grado, vómitos e hipertermia. Los signos clínicos se autolimitan en una o dos semanas. Sin embargo, pueden producirse cuadros crónicos e intermitentes de diarreas. Los signos clínicos extraintestinales son poco frecuentes e incluyen colangitis/colangiohepatitis, meningoencefalitis, septicemia y abortos.

Diagnóstico de campilobacteriosis

Las muestras deben remitirse en el medio Cary Blair, cuyo rendimiento para la recuperación de *Campylobacter* spp. es superior al de otros medios de transporte.

Observación microscópica directa: el diagnóstico presuntivo rápido es posible mediante microscopía de campo oscuro o de contraste de fases. Se examinan muestras fecales frescas para detectar bacterias curvas con la movilidad característica de *C. jejuni*. Este método es especialmente sensible en humanos (y quizás en perros y gatos) durante la fase aguda de la diarrea clínica. Con la tinción de Gram, se observan bacilos delgados gran negativos con forma de ala de gaviota, que se tiñen débilmente. Sin embargo, basándose únicamente en la morfología, estos organismos también podrían ser helicobacterias entéricas. Se debe determinar la presencia de leucocitos fecales, ya que pueden encontrarse en enteritis causadas por infecciones naturales o experimentales con *C. jejuni*.

Cultivo e identificación: habitualmente se utiliza el medio de Skirrow modificado por el agregado del suplemento reductor llamado FBP (sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, y piruvato de sodio al 0,5/1.000 p/v), extracto de levadura, cefoperazona y vancomicina. Se incuba durante 48 horas a 42 °C - 43 °C, en atmósfera microaerófila (3–5 % de O₂). Se pueden utilizar sobres generadores comerciales o jarras para intercambio de gases. Los sobres, similares a los utilizados para el cultivo de bacterias anaerobias, proporcionan una atmósfera de aproximadamente 3 a 5 % de O₂ y 5 a 12% de CO₂.

Otro método de recuperación de campilobacterias es la siembra por filtración, para lo cual se coloca una membrana filtrante de 0,45 µm sobre una placa de agar sangre. Se toca varias veces el centro del filtro con el hisopo cargado con material. Luego de 30 minutos, se despega cuidadosamente y se realizan las estrías para su aislamiento. Las campilobacterias, por ser muy delgadas, atraviesan la membrana, quedando retenidas enterobacterias, cocos gram positivos y levaduras, entre otras.

En general, las colonias de *C. jejuni* y *C. coli* pueden observarse luego 24 horas de incubación a 42 °C - 43 °C o de 48 horas a 37 °C. En ocasiones, el crecimiento tiene lugar luego de 72 - 96 horas. Las placas se examinan a las 48 horas. Las especies termófilas pueden crecer formando diferentes tipos de colonias: planas, no hemolíticas, de aspecto mucoso, grisáceas o de un leve tinte rosado. Son de bordes irregulares y tienden a diseminarse a lo largo de la estría de siembra. Pueden aparecer incoloras, semejando gotas de agua, o pueden crecer formando colonias enteras, convexas, brillantes y de 1 a 2 mm de diámetro.

Para su identificación presuntiva se realiza la tinción de Gram, observando las formas características espiraladas y esféricas o células en división unidas, semejando las alas de una gaviota, muy delgadas.

En los laboratorios clínicos solo se dispone de unas pocas pruebas para identificar las especies y subespecies de campilobacterias. En función de la temperatura de crecimiento, se agrupan en: especies termotolerantes que crecen a 42-43 °C, y las que no son: *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. fetus* y *Arcobacter butzleri*.

Se desarrollaron PCR múltiples para la identificación y diferenciación de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. fetus* spp. *fetus*. Cabe destacar que los cebadores específicos para el ARN23Sr pueden utilizarse como controles internos para identificar los géneros estrechamente relacionados *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Helicobacter*.

Clostridium perfringens* y *Clostridioides difficile

Clostridium perfringens y *Clostridioides difficile* son dos de las bacterias más comúnmente implicadas en la diarrea canina. Por diversas razones, los veterinarios se enfrentan a un dilema al intentar determinar si estos supuestos enteropatógenos causan diarrea en perros o gatos. Forman parte de la microbiota normal y su tasa de aislamiento suele ser similar en animales con y sin diarrea.

Las manifestaciones clínicas son extremadamente variables. Las indicaciones para realizar paneles entéricos fecales, que incluyen tinción de Gram, cultivo fecal e inmunoensayos para la detección de toxinas, están mal definidas, lo que resulta en pruebas indiscriminadas e interpretaciones erróneas de los resultados. Desafortunadamente, el procesamiento tardío de los paneles entéricos fecales puede resultar en un menor aislamiento de supuestos enteropatógenos bacterianos o en resultados falsos negativos en los inmunoensayos.

Como se menciona en este capítulo, existen otros enteropatógenos además de *C. perfringens* y *C. difficile*, y no existe un consenso uniforme entre los laboratorios de diagnóstico veterinario sobre qué especies bacterianas deben evaluarse o qué ensayos de diagnóstico deben utilizarse. Este problema se agrava por la falta de validación de muchos de los inmunoensayos comerciales que se utilizan rutinariamente para la detección de toxinas bacterianas.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens es un bacilo grampositivo, anaerobio, formador de esporas, que se ha asociado a brotes de diarrea aguda, a menudo grave, en humanos, caballos, perros y gatos. Se divide en cinco biotipos, del A al E, según la posesión de uno o más de los cuatro genes principales de toxinas: alfa (α), beta (β), iota (ι) y épsilon (ϵ). Cada biotipo puede expresar también un subconjunto de al menos otras diez toxinas establecidas, incluida la enterotoxina de *C. perfringens* (CPE), un factor de virulencia bien caracterizado cuya producción está corregulada con la esporulación. Aunque los cinco tipos pueden albergar el gen de la enterotoxina (*cpe*), la distribución global de cepas enterotoxigénicas es relativamente baja (alrededor del 5 %), y la mayoría de las cepas pertenecen al tipo A. En general, todas las cepas aisladas de perros son de tipo A, y solo un informe publicado documenta una infección de tipo C en cinco casos de enteritis hemorrágica letal peraguda canina. El *C. perfringens* tipo A enterotoxigénico se asoció con intoxicación alimentaria humana y diarrea esporádica; diarrea canina aguda y crónica, de intestino grueso y delgado; y un síndrome diarreico hemorrágico agudo. Se detectó CPE en las heces de 8 de 12 perros (67%) que tenían signos clínicos compatibles con el síndrome diarreico hemorrágico agudo. Una serie de otros factores de virulencia, como la toxina β_2 , también puede desempeñar un papel importante en la diarrea y podrían explicar por qué el aislamiento de cepas de tipo A no enterotoxigénicas de una muestra diarreica no excluye la participación en la enfermedad.

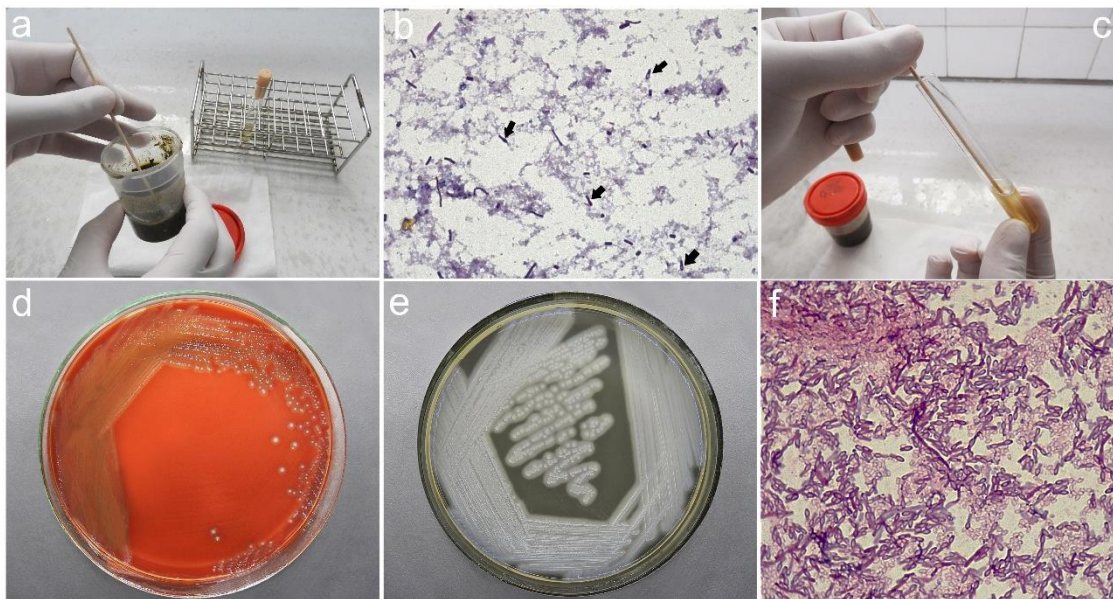
Diagnóstico de diarrea asociada a *C. perfringens*

No existe un método de referencia para el diagnóstico de la diarrea asociada a *C. perfringens* canina. Históricamente, se basó en la aparición simultánea de signos clínicos típicos, la detección de un gran número de endosporas de *C. perfringens* en frotis fecales (tres o más por campo de alta resolución) (Fig. 37-9) y la inmunodetección de ECP en muestras fecales. Se desaconseja la implementación de métodos citológicos y se enfatiza que para el diagnóstico debería utilizarse la combinación inmunodetección de ECP fecal y técnicas moleculares.

Dado que *C. perfringens* forma parte de la microbiota intestinal normal, el cultivo bacteriológico tiene importancia para la posterior caracterización molecular de los aislamientos, estudios epidemiológicos y pruebas de sensibilidad antimicrobianas.

Figura 7.3

Aislamiento de Clostridium perfringens a partir de materia fecal de un perro con diarrea



Nota. a: preparación de la muestra de materia fecal para su posterior siembra. b: observación directa de la materia fecal con tinción de Gram. Las flechas negras señalan los bacilos gram positivos. c: hisopo embebido con la suspensión de materia fecal para posterior siembra en agar sangre. d: colonias de *C. perfringens* en agar sangre luego de 48 de incubación a 37 °C en anaerobiosis. e: *C. perfringens* en agar yema de huevo. f: *C. perfringens* teñidos con tinción de Gram.

Clostridioides difficile

Al igual que *C. perfringens*, *Clostridioides difficile* forma parte de la microbiota comensal y se encuentra en el entorno de los hospitales veterinarios de animales de compañía. Si bien su rol como agente etiológico de infecciones en perros no está bien documentado, la mayor parte de la literatura se basa en el aislamiento bacteriano y se documentó la asociación entre la detección de la toxina A o la toxina B y la diarrea canina. En gatos, si bien hay poca información, estudios preliminares con un inmunoensayo comercial para la detección de la toxina A documentaron una incidencia del 5 % en 62 gatos con diarrea.

En *C. difficile* se describen tres toxinas: toxina A (TcdA, una enterotoxina), toxina B (TcdB, una citotoxina) y toxina binaria CDT (una ADP-ribosiltransferasa). Las enfermedades asociadas a *C. difficile* se atribuyen principalmente a la actividad de TcdA y/o TcdB. El mecanismo de acción de las toxinas es la inactivación de las proteínas Rho por glicosilación, ocasionando la despolimerización de los filamentos de actina, alterando el citoesqueleto celular con la consecuente modificación de la morfología y posterior muerte.

Diagnóstico de infección por *C. difficile*

Aunque las tasas de aislamiento de *C. difficile* son similares entre perros con y sin diarrea (del 0 % al 40 %), un cultivo negativo tiene un buen valor predictivo negativo mientras que el predictivo positivo del cultivo es limitado, ya que algunas cepas no son toxigénicas y las toxigénicas pueden diseminarse en ausencia de infección. El cultivo es útil para la caracterización genotípica de los aislamientos.

El diagnóstico de infección por *C. difficile* en perros y gatos debe basarse en una combinación de pruebas, que incluyen un cultivo fecal positivo y/o una prueba de antígeno común (GDH), seguida de una prueba ELISA para la detección de TcdA y TcdB en animales con GDH positiva.

La falta de un inmunoensayo diagnóstico estandarizado para perros y gatos dificulta la interpretación de los resultados positivos en los análisis de toxinas fecales cuando no se respaldan con el cultivo o antígeno común. No se puede descartar el posible papel de las cepas que son negativas para TcdA y positivas para TcdB, lo que subraya la importancia de utilizar inmunoensayos que detecten ambas toxinas.

El cultivo de materia fecal seguido por la detección de los genes de *C. difficile* que codifican sus toxinas, permite diferenciar las cepas toxigénicas de las no toxigénicas, mejorando así la especificidad del cultivo.

Cultivo: en agar sangre bajo condición anaeróbica, *C. difficile* forma colonias de morfología variada, sin ninguna característica particular. Por lo general, las colonias son grises, opacas y no hemolíticas luego de 24–48 horas, pero algunas cepas pueden ser de color azul verdoso debido a la hemólisis de tipo A. Después de 48–72 horas de incubación, las colonias pueden desarrollar un centro claramente gris claro a blanco. Con experiencia, *C. difficile* se reconoce fácilmente a pesar de la variabilidad de las colonias, gracias a su olor característico, que se asemeja al del estiércol de caballo. Si las colonias son negativas a la lecitinasa y la lipasa y muestran fluorescencia verde amarillenta cuando se iluminan con la lámpara de Wood, informe: presunción de “*C. difficile*”.

Referencias

- Carlóni G. *Clostridium*. (2019). N.O. Stanchi y colaboradores (Ed. 2°). *Microbiología veterinaria* (pp. 691-708). Ed. Intermédica.
- Fox, J.G., Greene, C. E., Stanley, L. M. (2012). Enteric Bacterial Infections. En C. E. Greene (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 370-397). Elsevier
- Lopardo, H.A. (2016). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. En H.A. Lopardo (Ed.), *Introducción a la microbiología clínica* (pp. 233-245). EDULP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52389>
- Moredo F.A. *Escherichia coli*. (2019). N.O. Stanchi y colaboradores (Ed. 2°). *Microbiología veterinaria* (pp. 482-495). Ed. Intermédica.

Vandepitte, J. (2003). Stool. En J. Vandepitte, K. Engbaek, P. Rohner, P. Piot y C. C. Heuck (Eds.) *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology* (pp. 37-59). World Health Organization Library.

CAPÍTULO 8

Infecciones bacterianas de piel

*Raúl Emilio Iza, Camila Aurnague, Hernán Darío Nieves y
Eliaana Andrea Lorenti*

En pequeños animales, especialmente en perros, las infecciones de la piel de origen bacteriano son muy frecuentes. Para comprender este tema, es importante destacar la importancia de la microbiota cutánea y las consecuencias de su alteración.

La microbiota cutánea normal está integrada por bacterias residentes y transitorias, las primeras son comensales no patógenas que viven en la superficie de la piel y en los folículos pilosos, manteniendo una población estática, constante, y su número total no es elevado. Las bacterias transitorias no suelen competir a largo plazo con la microbiota residente, pero pueden propagarse desde las membranas mucosas (especialmente las fosas nasales y la región perianal). Como ejemplo de grupos bacterianos presentes en la piel de perros sanos se describen especies de aerobios como *Micrococcus*, estreptococos β -hemolíticos y *Acinetobacter* y anaerobios, *Clostridium perfringens* y *Propionibacterium acnes*.

Infecciones de la piel

El patógeno bacteriano cutáneo canino más frecuente es *Staphylococcus pseudintermedius*, anteriormente identificado como *S. intermedius*. Reside principalmente en las fosas nasales y la región perianal, es un colonizador local transitorio y restringido en la piel canina clínicamente sana y un contaminante del pelo canino. La propagación desde la región perianal y las fosas nasales podría ocurrir durante el aseo normal o debido al lamido excesivo en perros con prurito y, especialmente, en perros alérgicos. Con mucha menos frecuencia, *S. aureus* y *S. schleiferi* también pueden causar infecciones cutáneas. Es probable que el reciente conocimiento de estas dos especies se deba a que se agrupan con *S. pseudintermedius* o simplemente no se identificaron a nivel de especie.

La identificación de estafilococos resistentes a la meticilina (SRM), y especialmente de *S. aureus* SARM, en perros, gatos y caballos también centró el análisis de su prevalencia en animales. La portación e infección con *S. pseudintermedius* RM, *S. schleiferi* RM y SARM se están identificando globalmente en perros y gatos, con una prevalencia aparentemente mayor. Es importante destacar que los SRM no poseen mayor virulencia que los estafilococos

sensibles a la meticilina. Sin embargo, el tratamiento eficaz es más problemático. Debido a la creciente preocupación por los SRM y los estafilococos multirresistentes, se están realizando cultivos bacterianos y pruebas de sensibilidad con mucha más frecuencia que antes. A partir de la mayoría de las pústulas o vías supurantes en perros con pioderma, se obtienen cultivos puros de *S. pseudintermedius*. En gatos, la infección con *S. aureus* podría ser más frecuente que en perros.

Generalmente, a partir de piodermas profundas, pueden aislarse junto a *S. pseudintermedius* bacterias invasoras gramnegativas secundarias, como *Proteus*, *Pseudomonas* o *Escherichia coli*. Sin embargo, si su aislamiento no es concomitante con estafilococos, deberá revisarse la técnica de obtención de la muestra para bacteriología, ya que la pioderma canina causada por bacterias gramnegativas sin coinfección estafilocócica es poco frecuente. La infección por *S. pseudintermedius* crea un entorno tisular más propicio para la invasión secundaria por bacterias gramnegativas.

Los factores que promueven la proliferación de *S. pseudintermedius* en la piel, son poco conocidos. Sin embargo, se demostró que los perros con otras enfermedades cutáneas son más propensos a desarrollar pioderma secundaria. Los perros con enfermedades cutáneas alérgicas, como la dermatitis atópica o defectos de la cornificación, presentan una alteración en el equilibrio de las especies bacterianas que colonizan la piel, de modo que pueden predominar los estafilococos coagulasa positivos. Clínicamente, esto se correlaciona con una mayor frecuencia de pioderma.

Las biopelículas o *biofilm*, agregados de microorganismos que se forman en las interfases, protegen a las bacterias de la acción de los antimicrobianos o de la respuesta inmune del hospedador y, por lo tanto, dificultan su eliminación. Este concepto, probablemente sea importante para comprender la pioderma, especialmente cuando se forman películas mucosas “eficaces” en la superficie de las lesiones infectadas.

Diagnóstico

Tipo de muestras

En heridas cerradas y biopsias, la muestra ideal es por punción. Para ello, se recomienda limpiar la superficie con uno o más hisopos embebidos en solución fisiológica estéril, desinfectar la zona con alcohol iodado, dejar actuar un minuto y, dado que el arrastre de lugol puede negativizar el resultado, retirarlo limpiando la zona con alcohol; por último, dejarlo evaporar.

En heridas abiertas, se recomienda eliminar el material necrótico y los tejidos desvitalizados, lavar con solución fisiológica estéril y desinfectar de la forma anteriormente descrita.

Dentro de las dermatitis, para la toma de muestras de pápulas, se deberá proceder de la misma manera que en las biopsias. Para el resto de las dermatitis, se actuará de manera particular de acuerdo a cada patología: en el caso de las pústulas se debe cortar el cabello con

tijeras y aspirar con aguja estéril de calibre estrecho. Si se observa exudado purulento en la aguja, aplicar a un hisopo estéril; de lo contrario, tocar suavemente el exudado expulsado de la pústula con un hisopo estéril y colocarlo en un medio de transporte. Para muestras de costras no será necesaria la desinfección de superficies. Utilizando una pinza estéril, se levanta el borde de la lesión y se procede a tomar la muestra, tocando con un hisopo estéril la superficie expuesta de la piel. Por último, en el caso de los collaretes epidérmicos, se corta el pelo con tijera, se desinfecta la superficie y se rota un hisopo estéril por el borde de la lesión dos o tres veces.

Para todas aquellas muestras que fueron tomadas mediante hisopado, es requerimiento la utilización de medios de transporte (Stuart o Cary Blair).

Se deben realizar raspados de piel en todos los perros con pioderma canina, ya que la sarna demodécica puede simular una pioderma sin complicaciones e inducir pioderma secundaria. Es especialmente importante raspar cualquier lesión pustulosa o papular con orientación folicular.

La pioderma secundaria a sarna demodécica sigue el mismo patrón de distribución, lo que facilita el diagnóstico. Es probable que en los raspados de piel se observe sarna demodécica en casos sospechosos de intertrigo del pliegue labial, foliculitis superficial, foliculitis profunda, forunculosis (acné canino, foliculitis podal) y celulitis.

Observación directa de la muestra

El examen citológico es sencillo, rentable y rápido para el diagnóstico de pioderma. Las muestras se obtienen mediante frotis directo de pústulas o la superficie de la piel inflamada. Se dejan secar al aire y se pueden colorear con de Wright de tipo Romanowsky modificada o con azul de metileno. La tinción de Wright modificada es beneficiosa tanto para documentar microorganismos como para identificar células inflamatorias. La identificación de cocos indica la probable presencia de *S. pseudintermedius*. El hallazgo de neutrófilos en degeneración y cocos intracelulares respalda el diagnóstico.

Cultivo, identificación y antibiograma

El cultivo bacteriano está indicado principalmente para determinar la bacteria involucrada en la infección y definir su comportamiento frente a los antimicrobianos disponibles para el tratamiento, y de esta manera, evitar fallas terapéuticas y resistencia antimicrobiana.

Los cultivos de pústulas, forúnculos y nódulos intactos tienen mayor probabilidad de proporcionar información útil. Los cultivos bacterianos de lesiones abiertas tienen menor probabilidad de producir resultados significativos debido a la posibilidad de cultivo de contaminantes.

En la Figura 8.1 se muestra una secuencia de fotos correspondientes a la marcha bacteriológica de una dermatitis digital canina.

Otitis externa

La otitis externa es una de las patologías más comúnmente diagnosticadas en pequeños animales. Se define como la inflamación aguda o crónica del epitelio del conducto auditivo externo (CAE), en algunos casos puede afectar al pabellón auricular. Si bien todas las especies animales pueden padecerla, los caninos son los más afectados.

Como se mencionó, para comprender la patogenia de esta enfermedad, es importante destacar el rol fundamental de la microbiota normal ocupando nichos microbianos y evitando la colonización de microorganismos patógenos. Entre las bacterias que se aislaron del CAE de perros clínicamente sanos se incluyen estafilococos coagulasa negativos, *Bacillus* spp., estafilococos coagulasa positivos (*S. pseudintermedius*), levaduras, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., estreptococos y *Micrococcus* spp., y en raras ocasiones, *Pseudomonas* spp. y *Proteus* spp. Sin embargo, pueden proliferar cuando el CAE está inflamado.

La otitis es una afección multifactorial, ya que en su origen interactúan diversos factores que ocasionan cambios en la fisiología y microbiota del oído externo. Sus causas se clasifican en predisponentes, primarias, secundarias y perpetuantes.

- Causas predisponentes: incrementan el riesgo de presentación. Como la conformación anatómica del CAE, tamaño del pabellón auricular, la humedad excesiva, entre otras.
- Causas primarias: inducen de forma directa la inflamación del CAE. Ectoparásitos (*Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei* y *Demodex* spp.), hipersensibilidad y cuerpos extraños, entre otras.
- Causas secundarias: contribuyen o causan patología en combinación con factores predisponentes. Se trata de bacterias y/o levaduras. La otitis bacteriana primaria es de baja incidencia, por lo general, producida por bacterias de la microbiota del CAE que aprovechan lesiones del tejido auricular para invadirlo y proliferar masivamente. Esto exacerba la respuesta inflamatoria dentro del canal auricular.

Los organismos bacterianos más comunes, aislados del CAE en perros con otitis externa crónica, incluyen *S. pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* seguidos por *Proteus* spp., β -estreptococos, *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *E. coli*. Determinar el microorganismo más probable, basándose en el examen citológico, permite iniciar el tratamiento empírico de inmediato en caso de otitis externa aguda, o el tratamiento inicial en caso de otitis externa crónica, a la espera de los resultados del cultivo y el antibiograma. Al igual que en oídos clínicamente sanos, las levaduras se identifican con mucha frecuencia. Si bien de forma poco usual, también se aisló *S. schleiferi* subespecie *coagulans* (coagulasa-

positiva) en perros con otitis externa tanto primaria como recurrente y *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* (coagulasa-negativa) en perros clínicamente sanos.

Entre los organismos identificados en los conductos auditivos de gatos asociados con otitis externa se incluyen estafilococos coagulasa-negativos, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* y *Pasteurella* spp. También se identificaron levaduras, con mayor incidencia, el género *Malassezia* spp.

- Factores perpetuantes: se deben al efecto de los factores predisponentes, causas primarias y secundarias, e impiden la resolución de las otitis. Se producen como consecuencia de las respuestas patológicas de la piel y las estructuras óticas. Por ejemplo: alteraciones timpánicas o modificaciones de la microbiota.

Diagnóstico

Toma, conservación y transporte de la muestra

Una correcta toma, conservación y transporte de la muestra al laboratorio de bacteriología resultan fundamentales para el éxito y la exactitud de los resultados.

Es importante considerar dos aspectos principales a la hora de obtenerla: que sea representativa del área de infección y que sea obtenida antes de iniciar un tratamiento antibiótico empírico, evitando así, la negativización de los resultados. De no ser posible, es necesario al menos suspender el tratamiento 4 o 5 días previo a la toma de muestra.

Procedimiento: se recomienda cortar el pelo, limpiar la superficie externa y los alrededores con un hisopo o algodón embebidos en solución fisiológica estéril y secar la zona posteriormente. Luego, introducir un hisopo estéril en la profundidad del CAE con la precaución de no tocar piel y zonas externas. Finalmente, rotar el hisopo varias veces con suavidad, extraerlo y taparlo inmediatamente.

La conservación y envío de las muestras deberá ser a 4 °C, no debiendo transcurrir un plazo mayor a 48 horas desde la toma de muestra hasta su procesamiento en el laboratorio. La muestra rotulada se deberá remitir con el protocolo correspondiente.

Observación directa de la muestra

La observación microscópica directa es una herramienta clave para evaluar el estado de la muestra, así como también, el ambiente y el contexto en el que fue tomada. Esta puede realizarse en fresco o con coloración.

En fresco

La observación microscópica en fresco resulta útil para la detección de ciertos ectoparásitos como *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei* y *Demodex* spp. y, además, observar la presencia de células inflamatorias.

Con coloración

Las tinciones utilizadas de forma rutinaria para este tipo de muestras son Giemsa, May-Grünwald Giemsa, Tinción 15 y Gram (ver capítulo 4).

Estas tinciones resultan útiles para la observación detallada de células inflamatorias, epiteliales y levaduras.

La interpretación de los hallazgos microscópicos debe realizarse en conjunto con el crecimiento bacteriano en los cultivos.

Cultivo

Selección de los medios de cultivo

Para el aislamiento bacteriano se utilizarán medios de cultivo que cubran sus requerimientos nutricionales como el agar sangre (AS) y, debido a la alta frecuencia de aparición de *Staphylococcus*, también se sembrará un agar manitol salado (AMS). Podría seleccionarse un agar cetrimide para aislamiento de *Pseudomonas*.

El aislamiento de estafilococos coagulasa negativa tiene valor microbiológico en aquellas muestras en las que se aíslan en cultivo puro y/o en pacientes con compromiso del sistema inmune.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas

En la Tabla 8.1 se mencionan las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se utilizan con mayor frecuencia para la identificación de los grupos bacterianos mencionados.

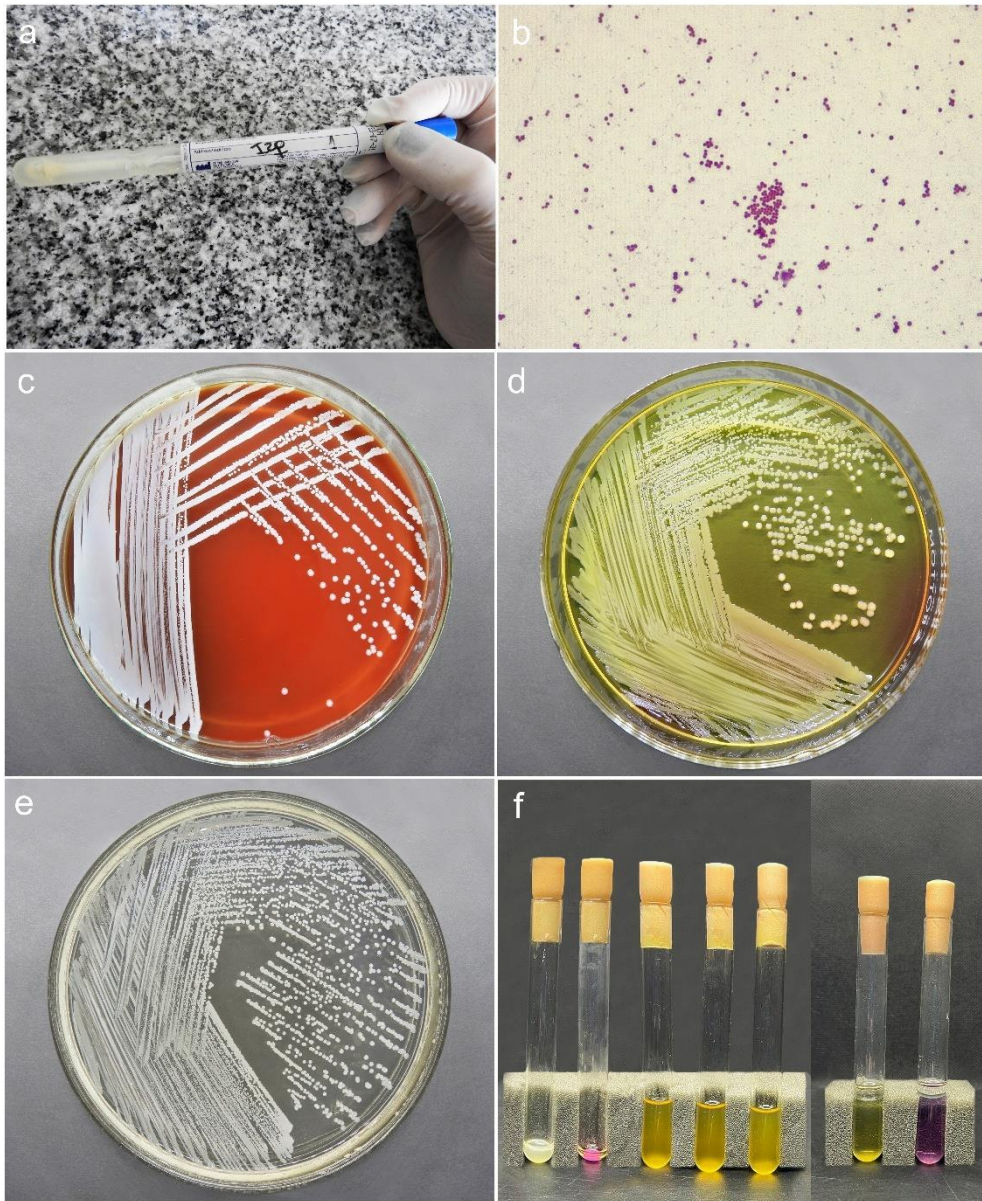
Tabla 8.1

Pruebas fisiológicas y bioquímicas para los principales agentes bacterianos relacionados

Grupo bacteriano	Batería de pruebas fisiológicas y bioquímicas básica
<i>Staphylococcus</i>	Catalasa, coagulasa. Para los coagulasa +: PYR (actividad enzimática pirrolidónilarilamidasa), fermentación de trehalosa, manitol, maltosa, Voges Proskauer (VP) y arginina descarboxilasa.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Oxidasa, desarrollo en agar cetrimide a 42 ° C, Urea, TSI.
<i>Enterobacterales</i>	Fermentación de glucosa, lactosa y producción de SH ₂ (Agar hierro triple azúcar-TSI), utilización de citrato de sodio, producción de indol, producción de ureasa, producción de lisina decarboxilasa.

Figura 8.1

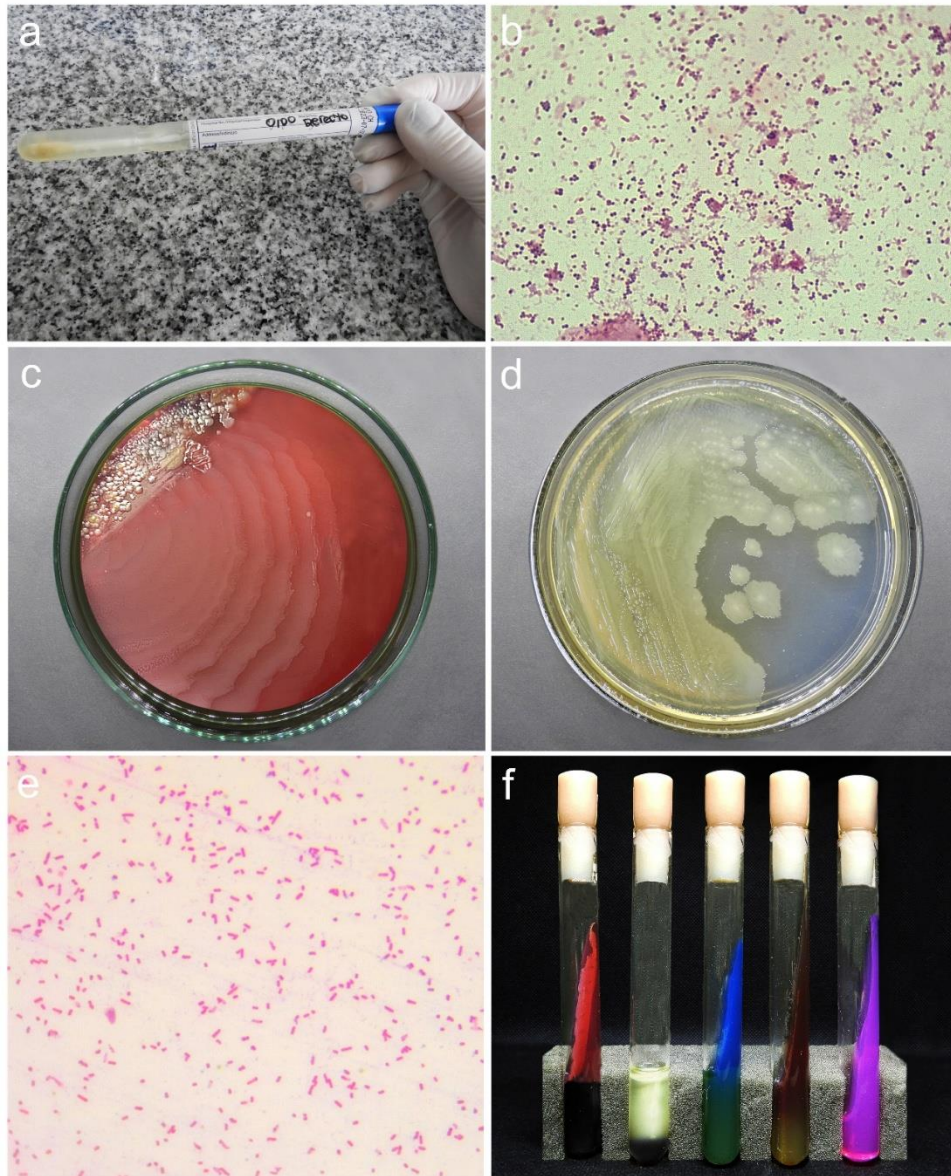
Otocultivo. Aislamiento de *Staphylococcus pseudintermedius*



Nota. a: hisopado de conducto auditivo externo con medio de transporte. b: observación de cocos gram positivos. c: cultivo primario en agar sangre, desarrollo de colonias blancas compatibles con estafilococos. d: desarrollo de colonias manitol positivas en agar manitol salado. e: *Staphylococcus pseudintermedius* en ATS. f: batería de pruebas de identificación bioquímicas y fisiológicas (de izquierda a derecha): coagulasa +, PYR +, fermentación de manitol, maltosa y trehalosa; arginina decarboxilasa +.

Figura 8.2

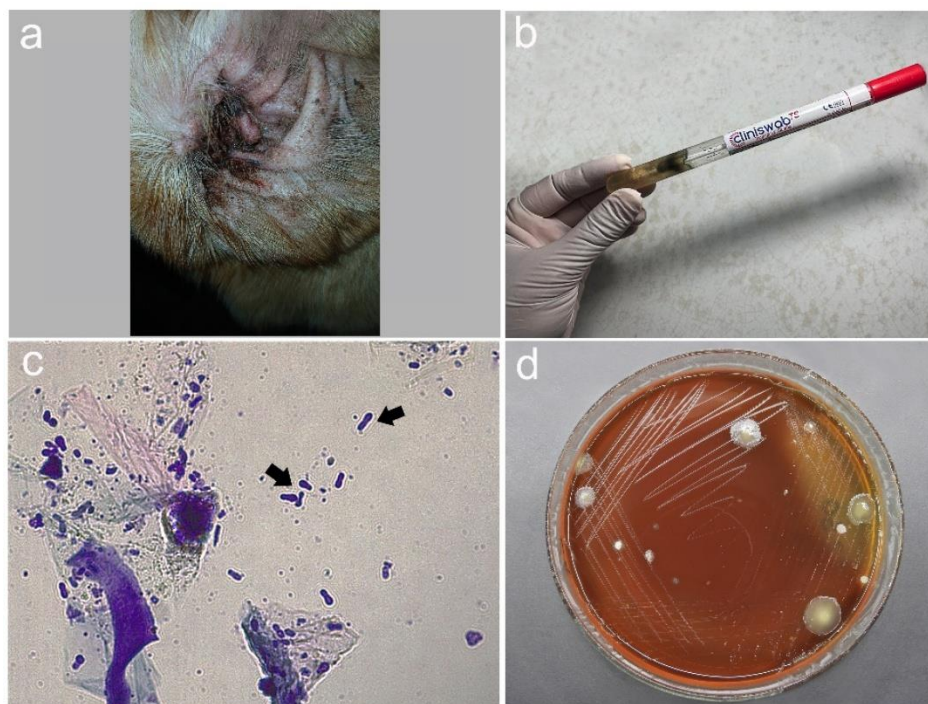
Otocultivo. Aislamiento de *Proteus* spp



Nota. a: hisopado de conducto auditivo externo con medio de transporte. b: observación directa con tinción de Gram, demuestra presencia de células epiteliales, levaduras brotantes compatibles con *Malassezia* spp. y bacterianas. c: en la primera estría se observa cultivo polibacteriano mientras que en la superficie del agar sangre se destaca el *swarming* típico de *Proteus* spp. d: desarrollo de *Proteus* spp en ATS, colonias grandes, chatas de bordes irregulares. e: tinción de Gram de cultivo puro de *Proteus* spp., bacilos gram negativos. f: batería de pruebas de identificación bioquímicas y fisiológicas (de izquierda a derecha): TSI, SIM, Citrato de Simmons, LIA (el color bordó como consecuencia de la desaminación oxidativa de la lisina), agar urea de Christensen.

Figura 8.3

Otocultivo. Presencia de levaduras brotantes compatibles con *Malassezia* spp. a partir de un hisopado ótico canino



Nota. La secuencia de imágenes corresponde al caso clínico de un perro con diagnóstico de otitis crónica. a: oído externo con inflamación manifiesta y acúmulo de cerumen con características compatibles de presencia de *Malassezia* spp. b: hisopado ótico con medio de transporte. c: observación directa de la muestra, abundante presencia de levaduras brotantes compatibles con *Malassezia* spp., señaladas con flechas negras. d: cultivo en agar sangre, escaso desarrollo polibacteriano.

Referencias

- Gentilini, E.R. Estafilococos. (2019). N.O. Stanchi y colaboradores (Ed. 2°). *Microbiología veterinaria* (pp. 444-453). Ed. Intermédica.
- Ihrke, P.J. y Cole, L.K. (2012). Integumentary Infections. En C.E. Greene (4th), *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 877-891). Editorial Elsevier.

CAPÍTULO 9

Urocultivo

María Laura Meneses

En la clínica práctica de pequeños animales, las infecciones bacterianas del aparato urogenital son de habitual presentación. Si bien *Escherichia coli* es la bacteria que está asociada con mayor frecuencia, pueden observarse infecciones por otro tipo de microorganismos, en especial hongos u otros tipos bacterianos.

La infección del tracto urinario (ITU) es la colonización microbiana de la orina o de cualquiera de los órganos del tracto urinario, excepto la porción distal de la uretra que está normalmente colonizada. La ITU puede afectar a más de un órgano, puede estar localizada en el tracto superior (pielonefritis bacteriana) o en el tracto inferior (cistitis o uretrocistitis bacteriana). La ITU bacteriana es más frecuente en las perras castradas, seguido por los machos castrados y las perras enteras.

Más del 70 % de las ITU en los perros son monobacterianas. La presencia de múltiples microorganismos es más probable en infecciones complicadas secundarias a alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario. Las bacterias gramnegativas aisladas con mayor frecuencia son *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*; dentro de las grampositivas se describen los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.

La infección con *Staphylococcus* o *Proteus* suele estar asociada a cálculos de estruvita debido a la alcalinización de la orina causada por el metabolismo de la urea por parte de las bacterias.

Se describieron casos que involucran bacterias menos comunes como *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium urealyticum* y *Clostridium* spp.

Las ITU son menos frecuentes en gatos que en perros. En machos jóvenes puede desarrollarse de forma secundaria a la cateterización urinaria o a una cirugía del tracto urinario, como uretrotomía perineal en gatos con obstrucción uretral. Las ITU son más frecuentes en individuos mayores de 10 años. Cuando las infecciones son de origen bacteriano, los géneros involucrados son los mismos que en los perros, excepto *Pasteurella* que es de hallazgo más común en gatos.

Para el diagnóstico de las infecciones urinarias en perros o gatos se debe realizar un análisis de orina completo. El cultivo de la orina (urocultivo) y posterior realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana son requerimiento para la implementación de la terapéutica correspondiente.

Toma, transporte y conservación de la muestra

La muestra de orina debe recogerse antes de iniciar el tratamiento terapéutico antimicrobiano, ya que si se realiza posteriormente es muy probable que se obtengan cultivos negativos por inhibición del desarrollo bacteriano. Si el tratamiento antimicrobiano ya fue iniciado y los síntomas de infección urinaria perduran, lo ideal es recoger la muestra entre 5 y 7 días luego de finalizarlo.

Existen tres técnicas de muestreo posibles para la obtención de orina, micción, cateterismo vesical y cistocentesis o punción vesical.

Micción

Se toma la muestra lo más alejada posible de la última micción, siendo lo ideal tres o más horas de retención y se procede a recolectar “al acecho” la porción media de la micción en un frasco estéril de boca ancha, descartando el primero y el último chorro.

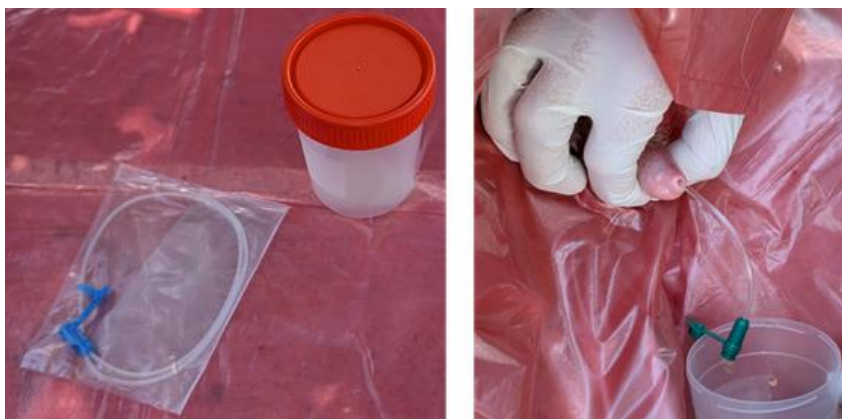
Esta técnica no es la recomendada para realizar el urocultivo debido a la alta probabilidad de contaminación del procedimiento.

Cateterismo vesical

El cateterismo o sondaje vesical se realiza en pacientes en los que la vejiga no es palpable o no es posible realizar una cistocentesis. La técnica debe realizarse siempre de forma aséptica, utilizando material estéril. En caninos y felinos machos, a diferencia de la recolección por chorro medio, este método introduce un número reducido de microorganismos de la microbiota normal en la muestra de orina. Por el contrario, el cateterismo de las perras, incluso cuando se realiza bajo una técnica aséptica, introduce un mayor número de la microbiota comensal. Por lo tanto, cuando se utiliza esta técnica de extracción, se debe tener en cuenta la observación de leucocitos y piocitos en el sedimento urinario para determinar si el desarrollo bacteriano es mono o polimicrobiano (Figura 9.1).

Figura 9.1

Obtención de muestra de orina por sondaje vesical de un canino



Cistocentesis o punción vesical

La punción vesical o cistocentesis es el método de elección para recolectar muestras para cultivo debido a que se trata, normalmente, de una muestra no colonizada o aséptica. Cualquier bacteria presente es indicativa de infección. Para su realización se debe comprobar que haya suficiente orina en vejiga (por palpación o ecógrafo), extraer con jeringa y aguja estéril y colocar la orina en frasco estéril.

Transporte y conservación de la muestra

Una vez obtenida, la muestra debe ir acompañada de un protocolo donde se detallen datos del propietario, reseña del paciente (nombre, especie, raza, sexo, edad), el método y horario de recolección utilizado, así como cualquier dato complementario, como por ejemplo si el animal recibió fluidoterapia o tratamiento previo con antibióticos. Los resultados obtenidos en el análisis de orina pueden estar alterados no solo por las maniobras de toma de muestra, sino también por el manejo y acondicionamiento de esta.

Los recipientes usados para transportar la muestra deben estar limpios, secos y libres de detergentes y agentes de limpieza ya que estos alterarán los resultados. Es por esta razón que en muchas ocasiones el laboratorio provee o recomienda el uso de los frascos colectores estériles comerciales.

Lo ideal es realizar el procesamiento de la muestra de orina en el laboratorio dentro de las 2 o 3 horas de obtenida o bien, conservarla refrigerada a 4 °C y remitirla dentro de las 6 - 8 horas. Nunca se deben congelar, pues se destruirán los elementos formes observables microscópicamente en el estudio del sedimento urinario. Las muestras mantenidas a temperatura ambiente se alteran con rapidez, ya que la mayoría de las veces, son recolectadas por chorro medio o sondaje (es decir que son muestras colonizadas con microbiota normal proveniente de uretra, vagina o prepucio). A medida que transcurren las horas, el crecimiento exponencial de los microorganismos presentes, altera la muestra ya que las bacterias toman como sustrato a la urea (metabolito que se elimina normalmente por orina) y la desdoblan a amoníaco que luego se combina con iones hidrógeno produciendo amonio. Consecuentemente, se incrementa el pH de la orina (tornándose alcalino) ocasionando la desintegración de los elementos formes que puedan estar presentes, ya que esas estructuras tienden a disolverse en orinas alcalinas.

Urianálisis

El urianálisis (análisis de la orina) completo consiste en tres exámenes diferenciados:

- Bioquímico: se evalúan alrededor de nueve componentes con utilidad clínica para valorar los estados de salud y de enfermedad.
- Macroscópico: en el que se evalúa el aspecto de la orina, su color y transparencia.
- Microscópico: se identifica y cuenta el tipo de células, cilindros, cristales y otros componentes como bacterias y moco, que podrían estar presentes en la orina. El examen microscópico, normalmente se realiza en el caso de encontrar alguna anomalía en los exámenes macroscópico o bioquímico, aunque también puede realizarse directamente si el veterinario lo solicita.

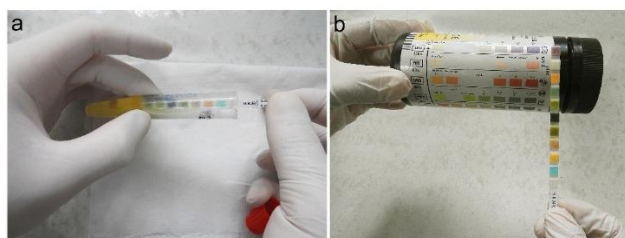
Un hallazgo anormal del urianálisis suele continuar con la repetición de la prueba para confirmar los resultados, o bien, la realización de pruebas adicionales en orina o en sangre para establecer un diagnóstico.

Examen bioquímico

Para realizar esta determinación, se utilizan con frecuencia las **tiras reactivas**, que pueden aportar parámetros químicos que guían el proceso de diagnóstico de las infecciones urinarias. Es necesario tener en cuenta que, tanto en gatos como en perros, algunos parámetros pueden dar resultados falsos (positivos o negativos) debido a la dieta u otras patologías (Figura 9.2).

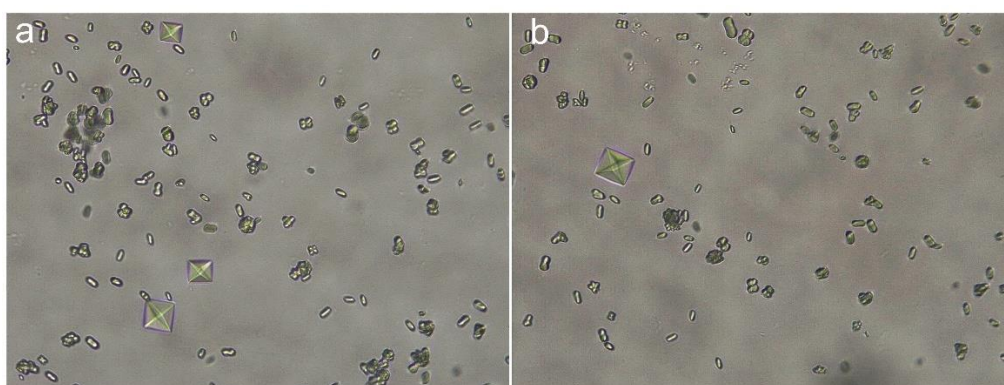
Las pruebas de las tiras reactivas que cobran mayor importancia en la interpretación de los urocultivos son:

- Esterasa leucocitaria: indicador indirecto de leucocitos.
- Presencia de nitritos: indica bacteriuria, ya que las bacterias degradan los nitratos urinarios.
- pH: puede variar según el microorganismo presente. Una orina alcalina sugiere la presencia de organismos ureasa positivos, como *Proteus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium urealyticum*. El pH ácido es más frecuente en las infecciones por *E. coli*.
- Densidad urinaria: es un parámetro que se observa con cierta precaución, ya que su variación no es indicativa de la presencia de un grupo bacteriano en particular. Por ejemplo, cuando la infección urinaria está causada por *Escherichia coli* la densidad puede estar baja o no.
- Sangre y proteínas: su presencia puede indicar infecciones urinarias.

Figura 9.2*Tiras reactivas para análisis bioquímico de orina***Examen microscópico del sedimento urinario**

El examen microscópico se realiza sobre el sedimento urinario. La orina se centrifuga a bajas revoluciones para concentrar las estructuras presentes en el fondo del tubo. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y unas gotas del sedimento se reservan para la observación.

- La técnica más frecuente es la **observación en fresco**. Se coloca una gota del sedimento urinario entre porta y cubreobjeto y se observa con objetivos de menor aumento (10 X) y luego mayor aumento (40 X). Se realiza el recuento de células, cristales y otras estructuras por campo. Células epiteliales, eritrocitos y leucocitos se informan como “escasos”, “aumentados” o “incontables”, mientras que las bacterias, mucus, cilindros, como presencia o ausencia (Tabla 9.1). Con fines microbiológicos, si bien los profesionales con años de experiencia tienen la habilidad para determinar la morfología de las bacterias observadas, la precisión puede verse reducida en muestras de orina de baja densidad. Es una técnica valiosa cuando los resultados son negativos, pero la predicción del positivo es deficiente.

Figura 9.3*Observación en fresco de sedimentos urinarios caninos*

Nota. a y b: escasa cantidad de cristales de oxalato de calcio. Magnificación 400 X.

- Observación con **tinción**: si bien no es una técnica frecuente para la observación de sedimento urinario en laboratorios clínicos, su implementación en bacteriología permite más precisión y detalle de las estructuras presentes en la muestra. Hay buena correlación entre los resultados de los frotis de orina de perro teñidos con Gram respecto al de los cultivos, cosa que no se vio con la observación en fresco. En algunas especies, la sensibilidad del frotis con tinción de Gram poder ser de 10^5 o más bacterias por mililitro.

Los hallazgos en el análisis del sedimento urinario que sugieren infección son piuria, hematuria y bacteriuria y se correlacionan con resultados positivos en el urocultivo. La más específica es la bacteriuria.

Tabla 9.1

Valores de los elementos que se pueden encontrar en la orina

Elementos	Escasa	Regular	Abundante
CEE	< 5 por campo	5 – 10 por campo	> 10 por campo
CET	< 5 por campo	5 – 10 por campo	> 10 por campo
Células renales	< 5 por campo	5 – 10 por campo	> 10 por campo
Eritrocitos	1	2	3
	< 5 por campo	5 – 10 por campo	> 10 por campo
Leucocitos	1	2	3
	< 5 por campo	5 – 10 por campo	> 10 por campo

Nota. CEE: Células epiteliales escamosas. CET: Células epiteliales de transición

Urocultivo

Existen numerosos medios de cultivo para sembrar muestras de orina y su elección debe contemplar la relación costo-beneficio, de modo de elegir la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos con el menor costo posible.

El medio CLDE (cisteína libre de electrolitos) es el más utilizado para el aislamiento, recuento e identificación presuntiva de microorganismos, ya que permite el desarrollo de la mayoría de los patógenos urinarios y previene el desarrollo invasor de *Proteus* spp. Es un medio deficiente en electrolitos. La peptona, el extracto de carne y la tripteína aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la L-cistina es el agente reductor, el azul de bromotimol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante. La diferenciación de las bacterias se basa en la utilización que puedan hacer de la lactosa; las bacterias que la fermentan acidifican el medio que vira del verde

al amarillo, mientras que las que no lo hacen, forman colonias incoloras que viran el medio al color azul. La restricción de electrolitos impide el desarrollo invasor de especies de *Proteus*, por tal motivo, es un medio ideal para el recuento de colonias.

Ante la sospecha de infecciones causadas por bacterias nutricionalmente exigentes, el medio de cultivo de elección es el agar sangre.

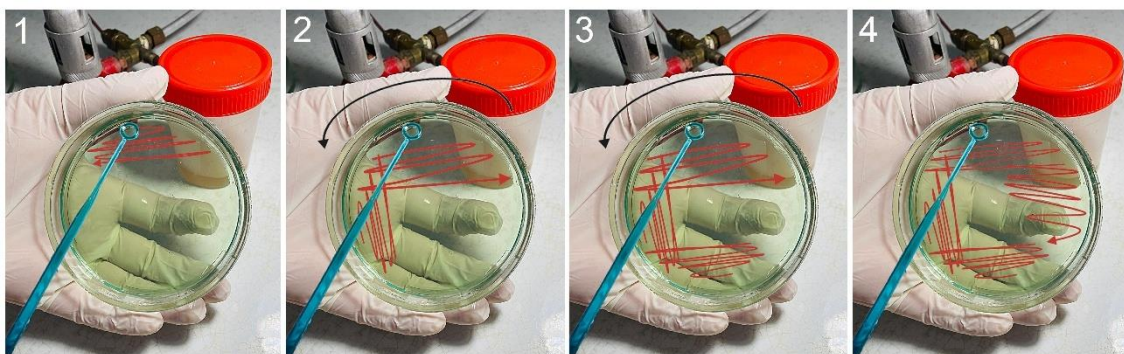
Técnica de siembra

La siembra debe realizarse a partir de la orina sin centrifugar utilizando la técnica por agotamiento. Si la orina fue obtenida en la micción y se utiliza un ansa calibrada, se podrá tener una estimación de la carga bacteriana presente.

La mayoría de las bacterias causantes de infecciones urinarias en perros y gatos son aerobias/anaerobias facultativas, mesófilas y de crecimiento rápido, por lo cual, la incubación de rutina se realiza en atmósfera ambiental, a 35 °C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 24 - 48 horas.

Figura 9.4

Técnica de siembra de orina con ansa calibrada en agar CLDE



Nota. Siembra de orina con ansa calibrada de 10 μl .

Interpretación del crecimiento bacteriano

Para la correcta interpretación de los urocultivos se deben tener en cuenta varios factores como la técnica de muestreo, los resultados de la observación microscópica del sedimento, el resultado del cultivo y la clínica del animal, entre otros.

Como se mencionó, en la mayoría de las ITU está involucrada una sola especie bacteriana que se encuentra en grandes cantidades (más de 10^6 UFC/ml). Se debe evaluar cuidadosamente toda la información recabada cuando se obtiene un urocultivo con aislamiento de múltiples tipos de bacterias o en cantidades bajas (menos de 10^3 UFC/ml). Una de las causas de obtención de cultivos polibacterianos, puede ser la contaminación de la orina con contenido intestinal. Cuando múltiples tipos de bacterias están presentes en la ITU, los catéteres urinarios permanentes o las anomalías anatómicas marcadas suelen ser la causa predisponente.

Perros. En perros machos, una concentración superior a 10^4 UFC/ml en una muestra cateterizada indica infección. Una concentración inferior a 10^3 UFC/ml sugiere contaminación. Valores intermedios pueden indicar contaminación o infección. Otra información del caso, como la historia clínica, la exploración física, los resultados del análisis de orina y el grado de posible contaminación durante el cateterismo, puede ayudar a determinar si existe infección cuando los resultados del cultivo no son concluyentes. Las muestras de orina de chorro medio o cateterismo de perras no deben utilizarse para cultivo debido a la probabilidad de contaminación.

Gatos. En gatos machos y hembras, en muestras de orina obtenidas por cateterismo, un recuento bacteriano superior a 10^3 UFC/ml se considera indicativo de infección. Si se debiesen analizar muestras de chorro medio de un gato disúrico y la contaminación durante la recolección fue mínima, un recuento superior a 10^5 UFC/ml sugiere infección. En algunos casos, se encontraron recuentos superiores a 10^5 UFC/ml que no correspondían a una infección, ya que los resultados del cultivo con la muestra obtenida por cistocentesis fueron negativos. Los resultados del análisis de orina deben correlacionarse con los del cultivo para determinar si las bacterias son resultado de una infección o contaminación.

Sondas urinarias permanentes. La cantidad de bacterias puede variar rápidamente en perros y gatos con sondas urinarias permanentes. Es importante realizar un cultivo de orina al retirar la sonda o 24 horas después.

La bacteriuria en el sedimento de una muestra de orina obtenida por cistocentesis con un resultado negativo en el urocultivo, puede ocurrir como consecuencia de microorganismos no viables, contaminación de la muestra, manipulación o cultivo inadecuados de la muestra, interpretación errónea del movimiento browniano o restos amorfos como bacterias. Los resultados falsos negativos (no se observan bacterias en el urocultivo, pero el resultado es positivo) son posibles porque debe estar presente un gran número de microorganismos para que la visualización sea consistente.

La piuria no siempre se asocia a bacteriuria; por lo tanto, la ausencia de piuria no puede utilizarse como evidencia de ausencia de bacteriuria. La piuria sin bacteriuria visible solo indica inflamación y está indicado un cultivo de orina para determinar si la infección es la causa. Las bacterias son más difíciles de detectar que los leucocitos en el examen del sedimento urinario. La infección con mínima invasión tisular puede no inducir piuria y la magnitud de la respuesta leucocitaria parece variar notablemente, incluso en el mismo animal.

Tabla 9.2

Criterio para determinar infección urinaria según la técnica de obtención de la muestra

Obtención de la muestra	Bacterias/ml	
	Contaminación	Infección
Micción	$< 10^5$	$> 10^5$ en gatos ^a indeterminado en perros

Cateterismo vesical	< 10 ³ perros machos. Presencia de bacterias en perras	> 10 ⁴ en perros machos > 10 ³ en gatos. Solo presencia en catéteres permanentes
Cistocentesis	< 10 ³ en gatos < 10 ^{3b}	> 10 ³

Nota. Adaptado de *Criteria for Determining Infection in Urine Specimens Based on Method of Collection*, J.A. Barsanti, 2012, Fuente: *Infectious diseases of the dog and cat*. a: un pequeño número de gatos clínicamente sanos presentó 10⁵ bacterias/ml con este método de recolección. b: la presencia de bacterias en la orina de la vejiga sugiere una infección, pero es posible que se detecten cantidades bajas debido a la contaminación de la piel o al procesamiento, ya que la mayoría de las infecciones del tracto urinario se asocian con una gran cantidad de bacterias.

Identificación fenotípica de los aislamientos

Una vez aislada la bacteria y analizadas las características de la colonia en el medio de cultivo seleccionado, comienza el proceso de identificación bacteriana.

Se analiza la morfología y se cuantifican las colonias.

Para determinar las características morfológicas y tintoriales de las bacterias aisladas, se realiza la tinción de Gram.

Según lo observado en los cultivos y en la tinción de Gram, se seleccionan las pruebas de identificación bioquímicas y fisiológicas correspondientes. A modo orientativo, se pueden seguir los flujogramas para las bacterias aisladas con mayor frecuencia a partir de urocultivos (Figura 9.5 y Figura 9.6).

Figura 9.5

Flujograma para identificación de bacterias Gram negativas

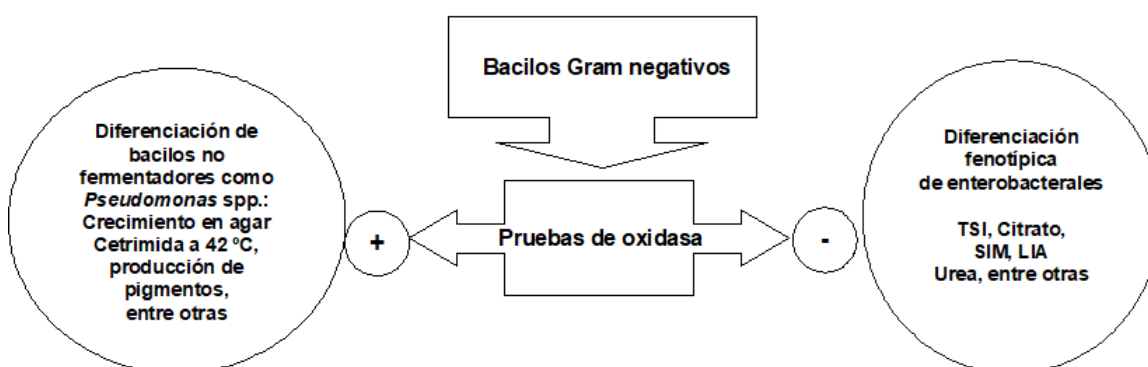
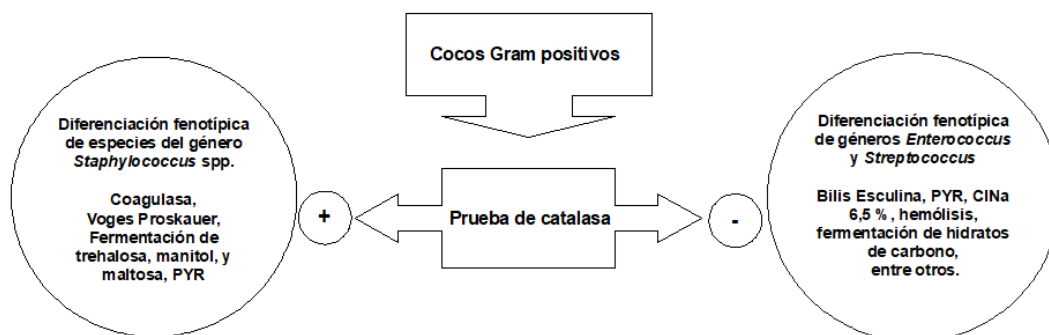


Figura 9.6

Flujograma para identificación de bacterias Gram positivas



El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas, caso contrario, pueden utilizarse diferentes sistemas comerciales. El resultado se coteja con pruebas estandarizadas o con perfiles numéricos de identificación.

Galería de imágenes

La Figura 9.7 corresponde al cultivo de orina de una hembra canina en el medio CLDE luego de 24 horas de incubación a 37 °C en atmósfera normal. El crecimiento es polibacteriano en la primera estría (10^3 UFC/ml). En este caso, si en el fresco no se observaron leucocitos ni formas bacterianas preponderantes, se puede considerar como muestra negativa. Si en el fresco se observaron leucocitos, se deben considerar posibles contaminaciones en la toma de muestra y/o errores en su conservación y transporte.

Figura 9.7

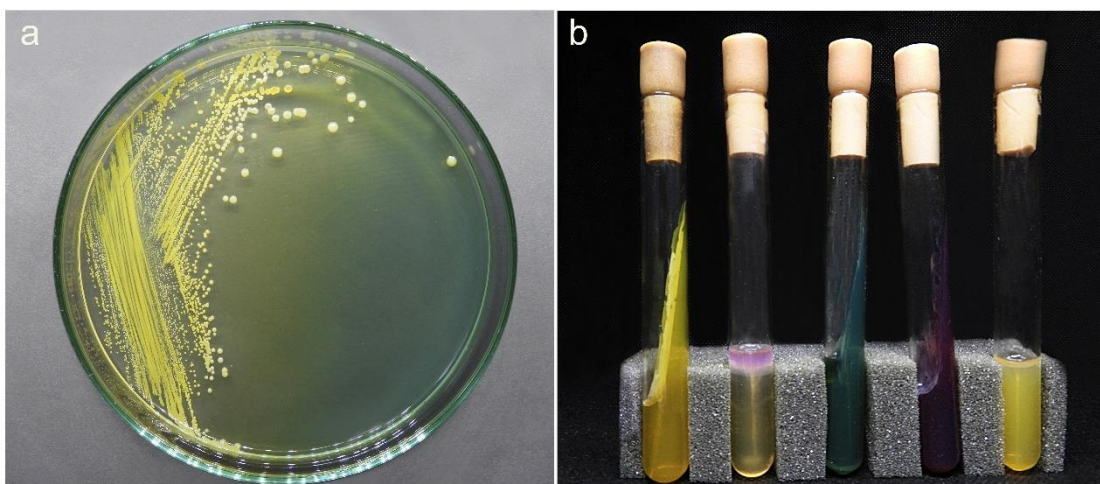
Crecimiento polibacteriano en CLDE



La Figura 9.8 corresponde al urocultivo de una hembra canina en el medio CLDE. Se observa crecimiento de un solo tipo de bacterias fermentadoras de la lactosa, colonias amarillas, con desarrollo hasta la segunda estría (10^4 UFC/ml). Mediante la interpretación de la batería de pruebas fisiológicas y bioquímica se identificó como *Escherichia coli*, en TSI: fermentó la glucosa y utilizó la lactosa, en medio SIM: indol positiva y móvil, citrato negativo, lisina descarboxilasa positiva y ureasa negativa.

Figura 9.8

Crecimiento en CLDE e identificación bioquímica de E. coli

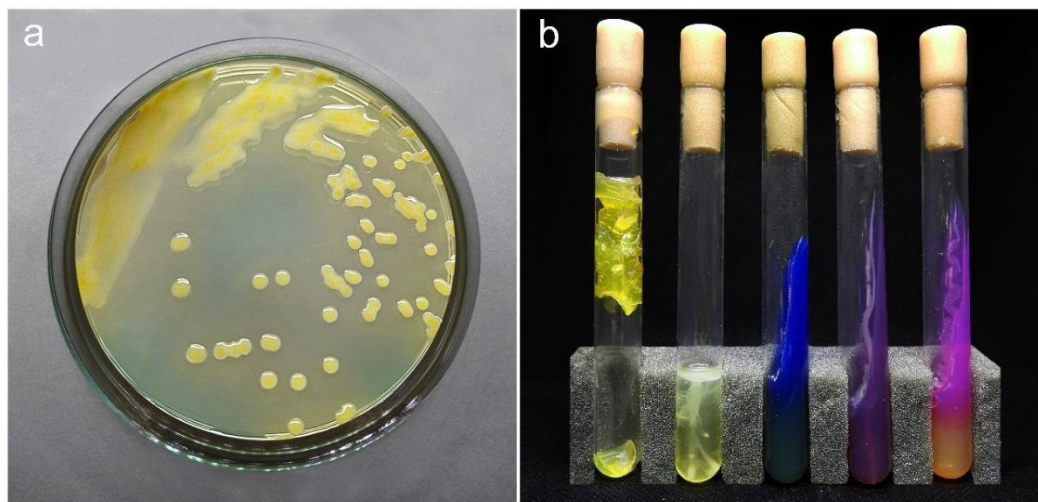


Nota. a: desarrollo de *E. coli* en CLDE. b: de izquierda a derecha, TSI, SIM, agar citrato de Simmons, LIA, agar urea de Christensen.

La Figura 9.9 corresponde al urocultivo de una hembra canina en el medio CLDE. Se observa crecimiento de un solo tipo de colonias mucosas, confluentes, amarillas (fermentadoras de la lactosa), con desarrollo hasta la cuarta estría (10^6 UFC/ml). Mediante la interpretación de la batería de pruebas fisiológicas y bioquímica se identificó como *K. pneumoniae*, en TSI: fermentó la glucosa con producción de gas, utilizó la lactosa, en medio SIM: indol negativa e inmóvil, citrato, lisina descarboxilasa y ureasa positiva.

Figura 9.9

Crecimiento en CLDE e identificación bioquímica de Klebsiella pneumoniae

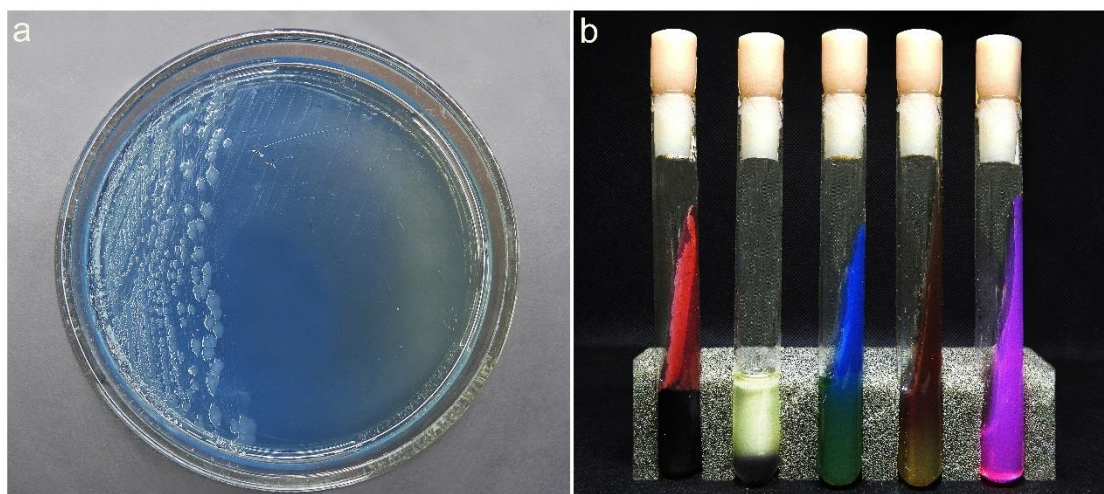


Nota. a: desarrollo de *K. pneumoniae* en CLDE. b: de izquierda a derecha, TSI, SIM, agar citrato de Simmons, LIA, agar urea de Christensen.

La Figura 9.10 corresponde al urocultivo de una hembra canina en el medio CLDE. Se observa crecimiento de un solo tipo de colonias (no fermentadoras de la lactosa), con desarrollo hasta la segunda estría (10^4 UFC/ml). Mediante la interpretación de la batería de pruebas fisiológicas y bioquímica se identificó como *Proteus mirabilis*, en TSI: producción de SH_2 , no utilizó la lactosa, en medio SIM: indol negativa y móvil, citrato negativo, en medio LIA se observa color bordó debido a la desaminación de la lisina y ureasa positiva.

Figura 9.10

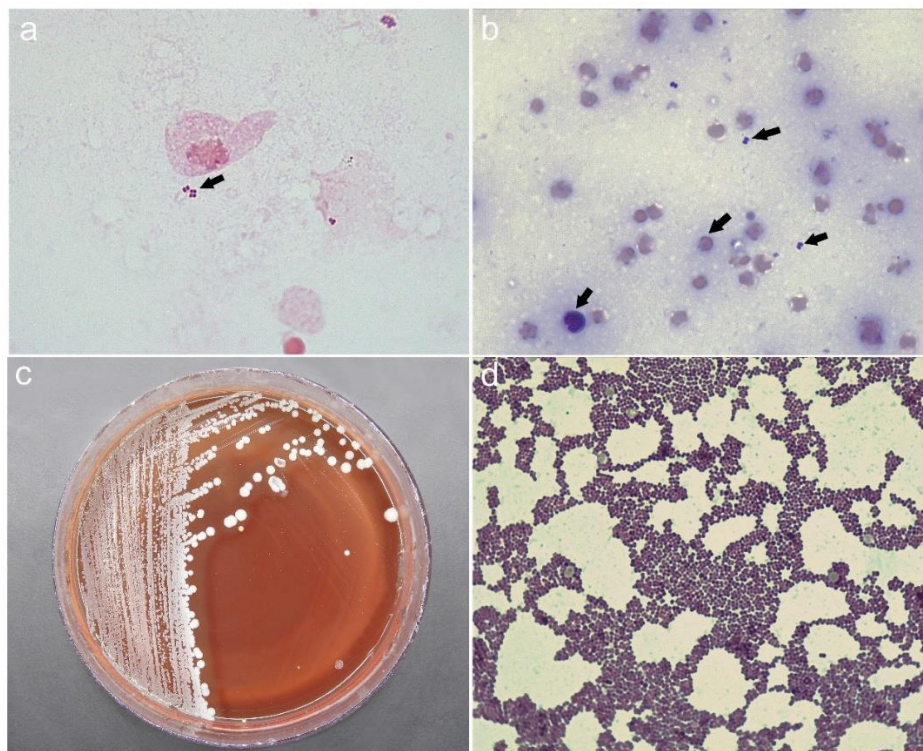
Crecimiento en CLDE e identificación bioquímica de Proteus mirabilis



Nota. a: desarrollo de *Proteus mirabilis* en CLDE. b: de izquierda a derecha, TSI, SIM, agar citrato de Simmons, LIA, agar urea de Christensen.

Figura 9.11

Aislamiento de Staphylococcus pseudintermedius a partir de la colecta vesical de un gato con obstrucción uretral



Nota. a: observación directa con tinción de Gram, cocos gram positivos y célula de transición en raqueta. b: observación directa con Giemsa, bacterias en forma de cocos, un leucocito y eritrocitos. c: cultivo primario en agar sangre con predominio hasta tercera estría, de colonias blancas. d: tinción de Gram poscultivo, cocos gram positivos en racimo.

Referencias

- Barsanti, J.A. (2012). Genitourinary Infections. En C.E. Greene (4th), *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 1013-1031). Editorial Elsevier.
- Fontana, L. y Pintos. ME. (2021). Análisis de orina: examen microscópico del sedimento urinario. En M. S. Arauz, L. L. Fontana y P. L. Martin (coordinadoras), *Atlas de orina Análisis de orina e interpretación de los resultados en caninos, felinos y equinos* (pp. 90-114). Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/129690>
- Meneses, M.L. y Nievas V.F. (2021). Urocultivo. En M. S. Arauz, L. L. Fontana y P. L. Martin (coordinadoras), *Atlas de orina Análisis de orina e interpretación de los resultados en caninos, felinos y equinos* (pp. 115-131). Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/129690>

Stornelli, M.C. y Pretti, R. (2021). Análisis de orina: recolección, conservación y envío. En M. S. Arauz, L. L. Fontana y P. L. Martin (coordinadoras), *Atlas de orina Análisis de orina e interpretación de los resultados en caninos, felinos y equinos* (pp. 49-63). Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/129690>

TERCERA PARTE

Procesamiento de muestras clínicas Bacteriología Especial

CAPÍTULO 10

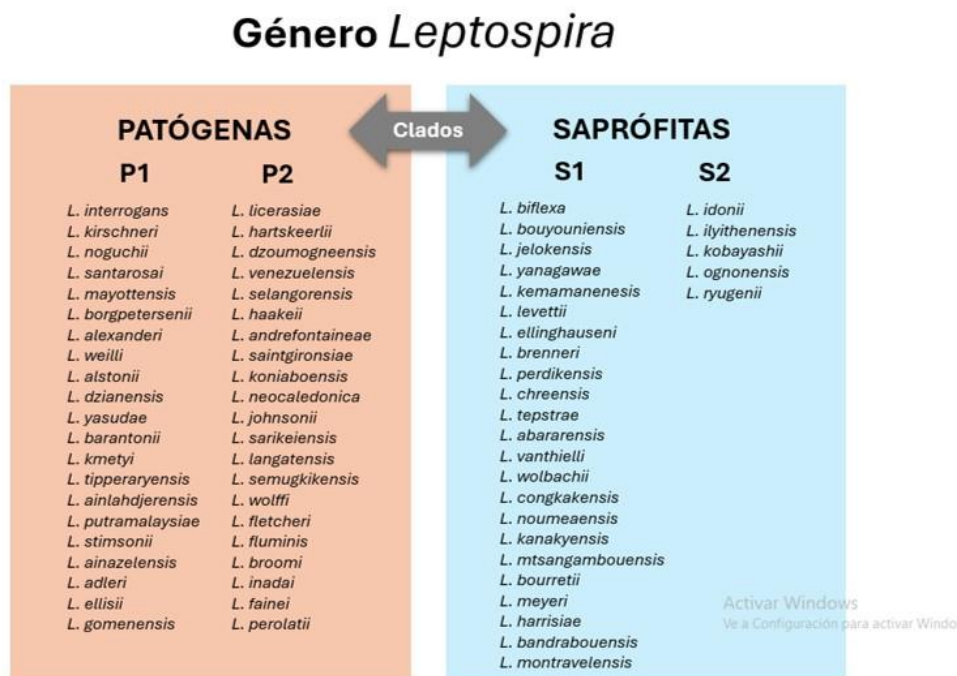
Leptospirosis

Paula Lorena Martín

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, con relevancia para la salud pública, el bienestar animal y la producción agropecuaria. El género *Leptospira* está integrado por 70 especies agrupadas en 2 clados, el S “saprófitas”, que incluye especies aisladas de ambientes naturales que no causan infecciones y el P “patógenas/intermedias”, que integra a todas las especies responsables de infecciones en animales y seres humanos. Ambos clados se dividen en 2 subclados (Figura 10.1).

Figura 10.1

División del género Leptospira en clados y subclados



Con respecto a la infección con *Leptospira* spp., numerosas especies de animales domésticos y silvestres son susceptibles. Particularmente en pequeños animales, es más frecuente en caninos domésticos; la enfermedad puede ser subclínica o clínica. En este último caso, la manifestación puede ser sobreaguda, aguda, subaguda o crónica y la gravedad se ve

influenciada por factores como edad del paciente, estado inmunitario y virulencia de la cepa infectante.

Para el diagnóstico presuntivo de leptospirosis, se combinan los datos obtenidos en la anamnesis, el examen físico, estudios hematológicos, bioquímica clínica y urianálisis; la confirmación se puede realizar mediante el diagnóstico serológico (indirecto) o diagnóstico directo (aislamiento bacteriano, observación microscópica o aplicación de técnicas moleculares).

Debido a que las pruebas disponibles tienen ciertas limitaciones en su aplicación y que es necesario arribar al diagnóstico de la enfermedad por ser de denuncia obligatoria, se recomienda la combinación de ambos tipos de diagnóstico.

En este capítulo se describirán los métodos de diagnóstico directo e indirecto de la leptospirosis en pequeños animales.

Diagnóstico por métodos directos

Aislamiento e identificación bacterianos

El aislamiento y la identificación bacterianos son los métodos más valiosos para identificar serovares y aportar información epidemiológica sobre especies circulantes en una región; sin embargo, es menos útil para tomar decisiones rápidas en el escenario clínico.

Dados los requerimientos nutricionales que tiene este grupo bacteriano, se utilizan medios de cultivo especiales adicionados con vitamina B y ácidos grasos de cadena larga, siendo el más utilizado el medio semisólido de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). Para muestras provenientes de áreas colonizadas, se recomiendan medios selectivos que tienen el agregado de sustancias inhibidoras, 5 fluorouracilo (5FU), o bien, soluciones de antimicrobianos como sulfametoxazol, trimetoprima, anfotericina y fosfomicina junto con 5FU (STAFF) (Figura 10.2).

La siembra puede realizarse a partir de muestras de sangre, orina o tejidos antes de la administración de antimicrobianos. En relación con la elección de cada tipo de muestra, se recomienda que la sangre sea extraída en los primeros 10 días de la aparición de los signos clínicos, mientras que la orina se extrae luego de este periodo. Cuando el comienzo de la enfermedad es desconocido, se deben enviar ambas muestras con el fin de incrementar la posibilidad de aislamiento.

Las leptospiras tiene condiciones de incubación particulares:

- Tiempo: requiere de periodos de incubación prolongados, entre 4 y máximo de 6 meses antes de considerarlos negativos.
- Temperatura: a diferencia de otros grupos bacterianos, la temperatura óptima de crecimiento de las leptospiras es de 29 °C.

El desarrollo bacteriano debe controlarse semanalmente mediante observaciones del cultivo con microscopio de fondo oscuro. La confirmación y caracterización del aislamiento se realiza mediante pruebas moleculares e inmunoserológicas. En ocasiones, puede observarse desarrollo macroscópico en forma de anillos de Dinger, no obstante, la falta de este hallazgo no descarta el crecimiento positivo (Figura 10.3).

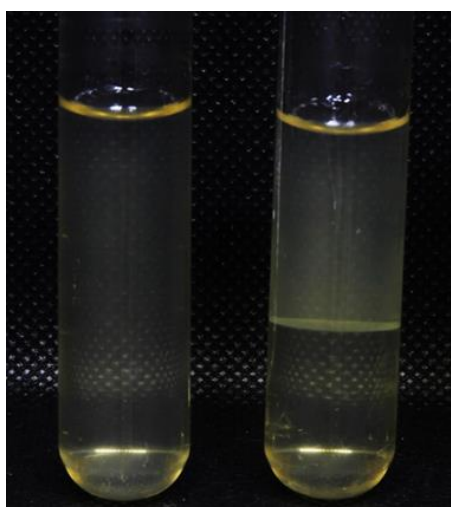
Figura 10.2

Medio de cultivo especial EMJH



Figura 10.3

Medio semisólido EMJH sembrados con una muestra de orina de un canino con sospecha de leptospirosis



Nota. En el tubo de la derecha se observa la formación de un anillo de Dinger.

Procesamiento de muestras clínicas: sangre, orina y órganos

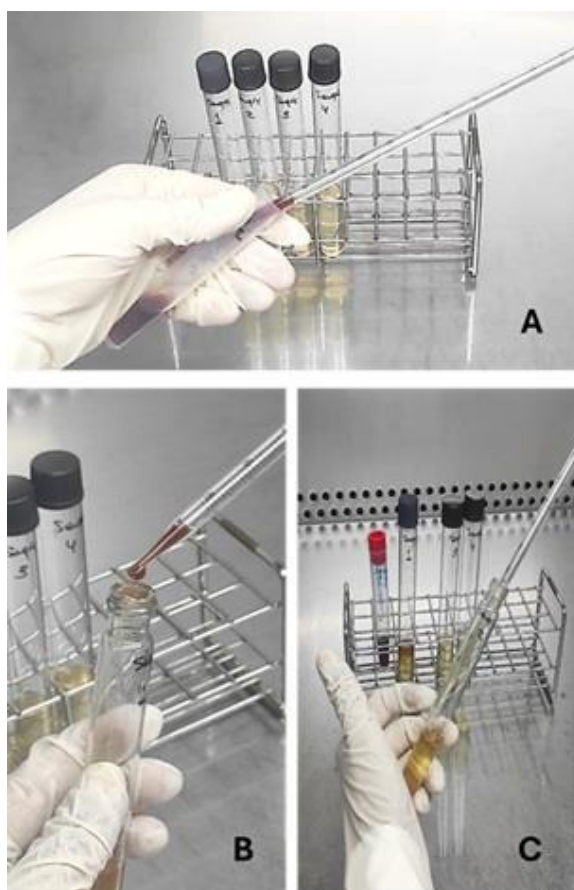
Para la siembra de **muestras de sangre** u de **orina obtenida por punción vesical** se colocan entre 0,5 y 1 ml en el primero de una serie de 4 tubos con medio semisólido EMJH y se realizan diluciones seriadas con el fin de minimizar los efectos inhibitorios de este tipo de muestra (Figura 10.4).

Para las **muestras de orina obtenidas por sondaje** (muestra colonizada) se recomienda utilizar medios selectivos o bien sembrar 1 ml de orina previo pasaje por filtros esterilizantes de 0,22 μm (Figura 10.5).

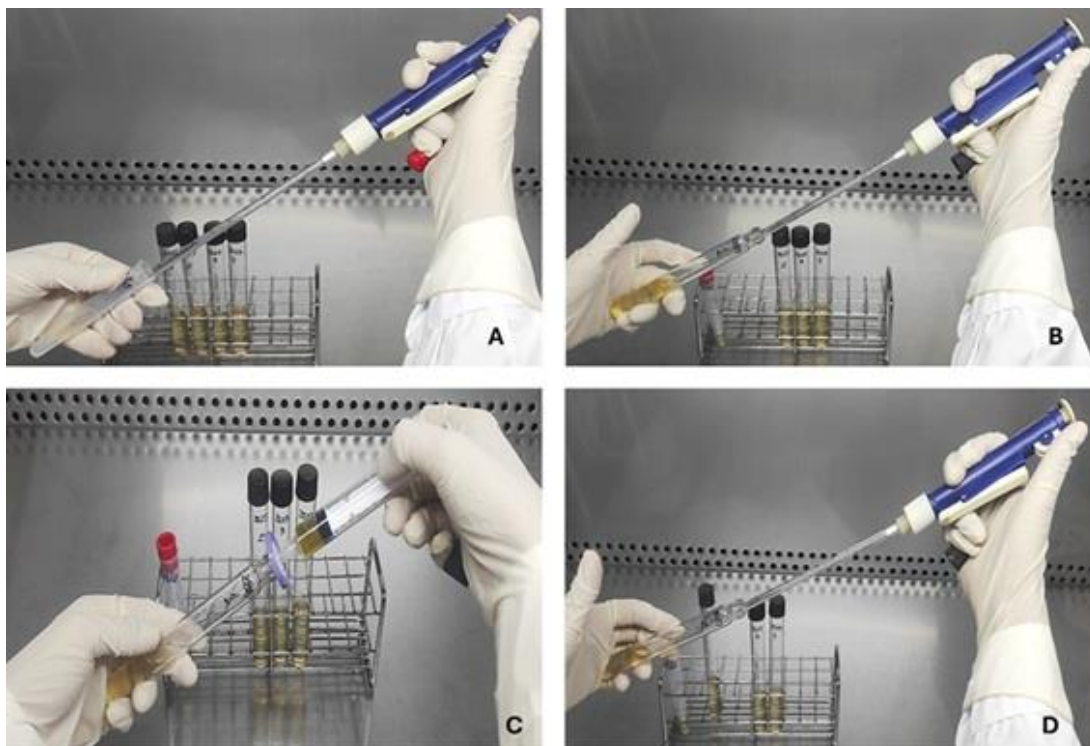
En aquellos casos que se disponga de órganos de necropsia, la muestra de elección son los riñones.

Figura 10.4

Técnica de siembra de una muestra de sangre para diagnóstico de leptospirosis



Nota. A: Recolección con pipeta estéril de 0,5 - 1 ml de sangre extraída en un tubo con heparina. B: Siembra en el primero de una serie de 4 tubos conteniendo medio semisólido de EMJH. C: Diluciones seriadas en base diez en los tres tubos restantes.

Figura 10.5*Técnica de siembra de una muestra de orina para diagnóstico de leptospirosis*

Nota. A: Recolección con pipeta estéril de 0,5 -1 ml de orina extraída por punción vesical en un tubo estéril. B: Siembra en el primero de una serie de 4 tubos conteniendo medio semisólido de EMJH. C: Siembra de orina extraída por sondaje previo pasaje por un filtro de 0.22 µm. D: Diluciones seriadas en base diez en los tres tubos restantes.

Detección molecular de leptospiras

Para el diagnóstico en pequeños animales la técnica molecular más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta prueba presenta como ventaja la posibilidad de detección del ADN de *Leptospira* spp. antes de la aparición de los anticuerpos, lo que la convierte en una valiosa herramienta de diagnóstico temprano en el curso de la enfermedad.

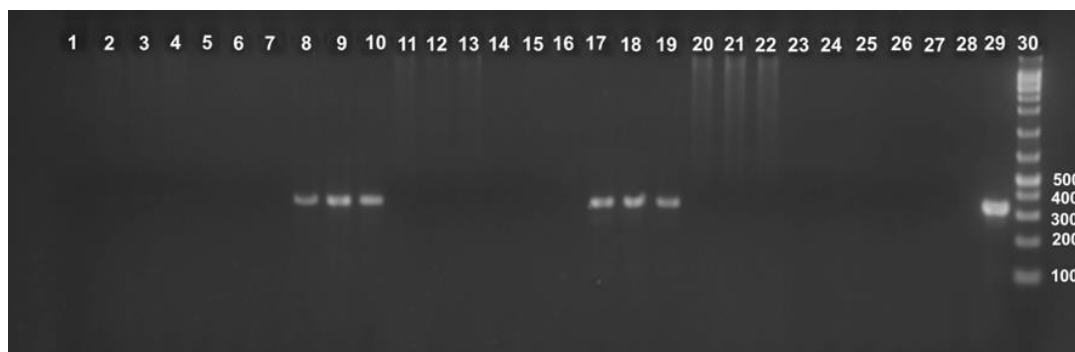
Para la confirmación diagnóstica, la PCR se realiza a partir de muestras de sangre u orina, no obstante, en casos de necropsia se pueden enviar muestras de tejido, como riñón y pulmón. Al igual que con el cultivo, se recomienda enviar sangre completa extraída en los primeros 10 días de la enfermedad y orina después de la primera semana. Si se desconoce el tiempo de la infección, se pueden enviar ambas muestras para aumentar la posibilidad de detección.

En las últimas décadas se han desarrollado múltiples ensayos dirigidos a diferentes genes conservados dentro del genoma de *Leptospira*, siendo los más utilizados los fragmentos de los genes *rrs* y *lipL32*, que codifican el ARN ribosomal 16S y una lipoproteína de membrana externa

respectivamente. Con respecto a las técnicas de la PCR, existen protocolos de punto final, o en tiempo real con incorporación de controles internos de amplificación, siendo esta última la de elección por su sensibilidad y menor probabilidad de contaminación con productos amplificados (Figura 10.6 y Figura 10.7).

Figura 10.6

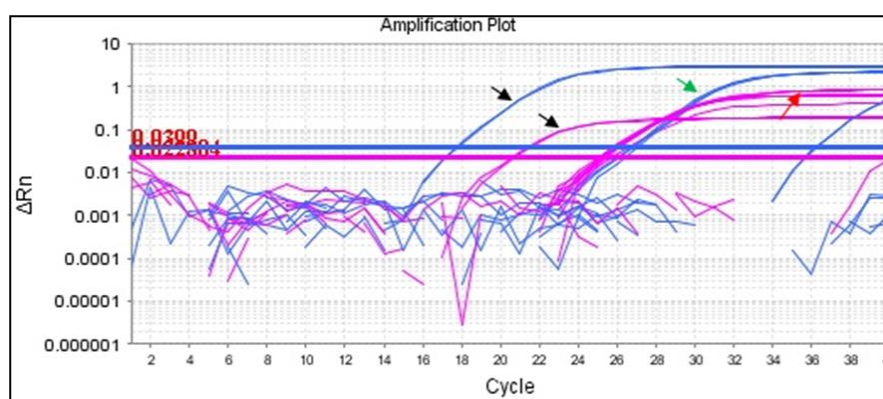
Gel de agarosa de un ensayo de PCR punto final dirigida a un fragmento del gen rrs



Nota. Calle 1: control negativo de PCR. Calle 2-7: muestras de sangre con EDTA y suero negativas. Calle 8-10: muestra de orina del mismo paciente positiva. Calle 11-13: muestras de sangre con EDTA y suero negativas. Calle 17-19: muestra de orina del mismo paciente positiva. Calle 20-28: muestras de sangre con EDTA, suero y orina negativas. Calle 29: control positivo de PCR correspondiente a una banda de 331pb. Calle 30: Marcador de peso molecular de ADN, 100bp.

Figura 10.7

Gráfico de amplificación correspondiente a una PCR en tiempo real realizada a partir de sangre con EDTA, suero y orina de un paciente con sospecha de leptospirosis



Nota. Flechas negras: corresponden al pocillo del control positivo (curva azul) más el control interno de amplificación (curva rosa). Flecha verde: corresponde a las curvas de la muestra de orina positiva por triplicado. Flecha roja corresponde a las curvas del control interno de amplificación de la muestra positiva y del resto de las muestras negativas.

Diagnósticos indirectos

Prueba de aglutinación microscópica

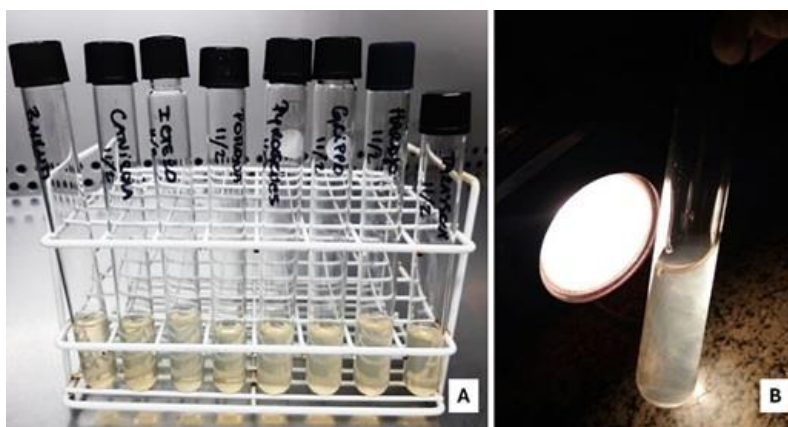
La prueba de aglutinación microscópica (MAT), es el método serológico de referencia para el diagnóstico de leptospirosis tanto en seres humanos como en animales. La misma, consiste en enfrentar el suero diluido del paciente sospechoso, con los antígenos (cultivos vivos) de *Leptospira* spp., crecidos en medio líquido EMJH (Figura 10.8). En la realización de la prueba deben incluirse todos los serovares epidemiológicamente relevantes en la región y aunque no existe una normativa al respecto, en Argentina, para el caso de caninos, se recomiendan como mínimo 6 serovares mientras que para felinos se deberían incluir 24 serovares (uno de cada serogrupo).

En caninos, se parte de una dilución del suero 1:100 y en felinos 1:25 y se enfrenta con los distintos antígenos para verificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. Posteriormente, aquellos sueros que reaccionaron a la primera prueba son diluidos en progresión geométrica en base 2 hasta la última dilución que presente la aglutinación mencionada y es considerada como título final (Figuras 10.9.A, 10.9.B y 10.10). La lectura se realiza en el microscopio de fondo oscuro y se considera reactivo aquel suero que aglutina el 50 % de *Leptospira* spp., en comparación con un testigo (Figura 10.11).

Con el fin de realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos mediante la prueba de MAT, se deben evaluar muestras del paciente en el período agudo y convaleciente para evidenciar seroconversión (aumento de cuatro veces en el título entre ambas muestras).

Figura 10.8

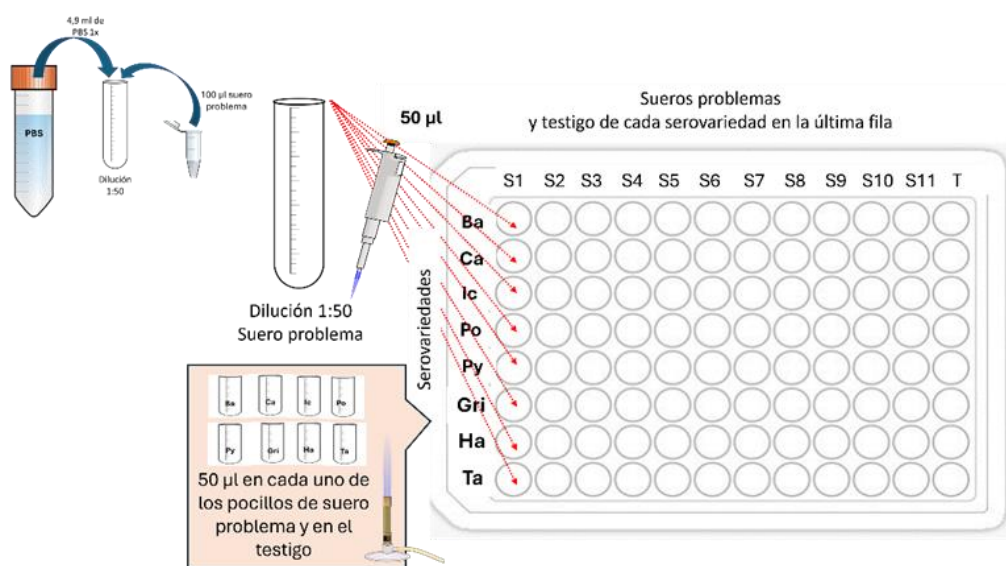
Panel de serovares de *Leptospira* para la realización de MAT



Nota. A: Panel de antígenos en medio líquido de EMJH utilizados para la prueba de MAT en pequeños animales. B: Desarrollo de un cultivo de *L. interrogans* serovar Canicola en la que se observa la producción de ondas muaré a modo de un velo en el medio líquido.

Figura 10.9.A

Esquematzación de la serie de diluciones para la realización de la MAT con suero canino

**Figura 10.9.B**

Esquematzación de las diluciones seriadas de sueros caninos previamente reactivos a *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola y *L. interrogans* ser. Pyrogenes

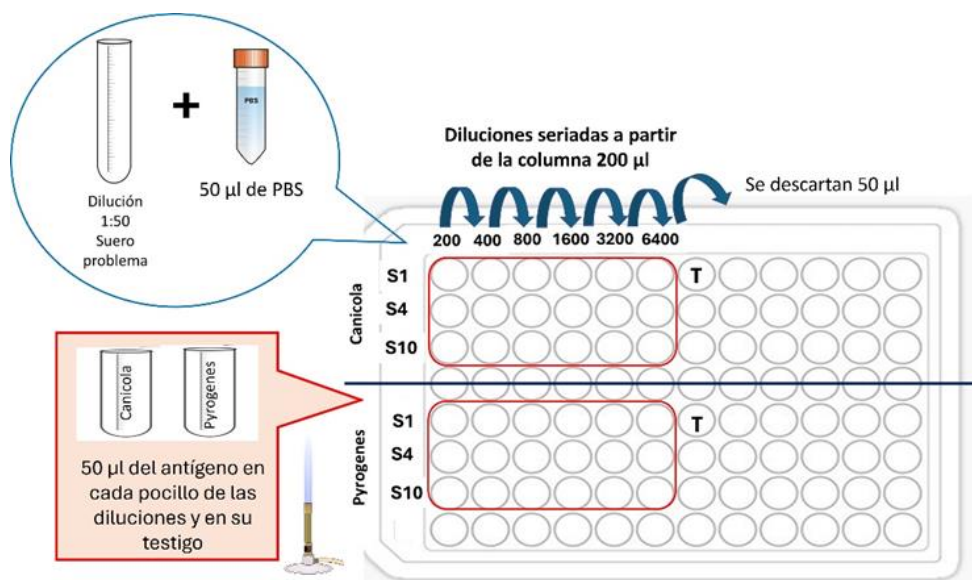
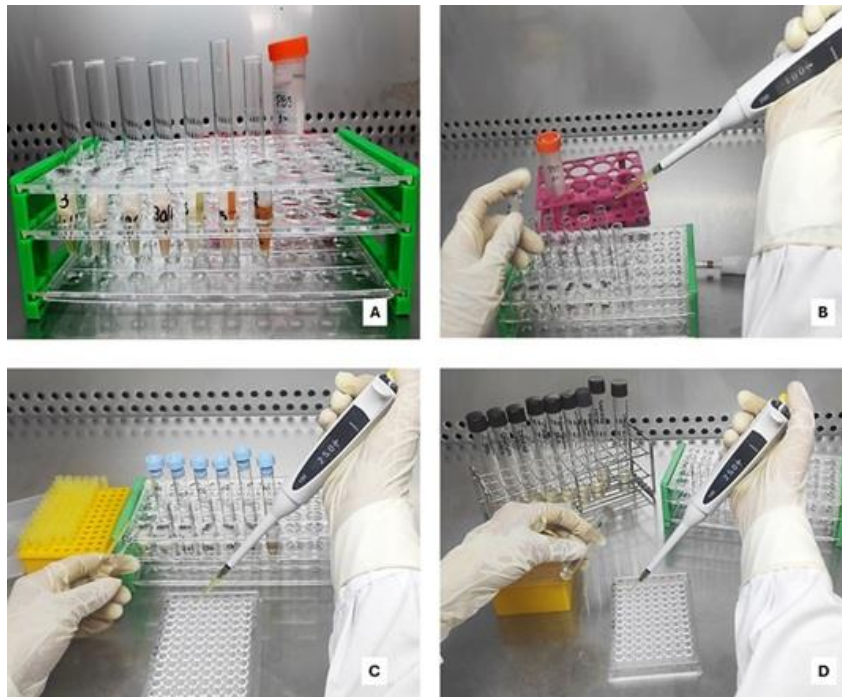


Figura 10.10

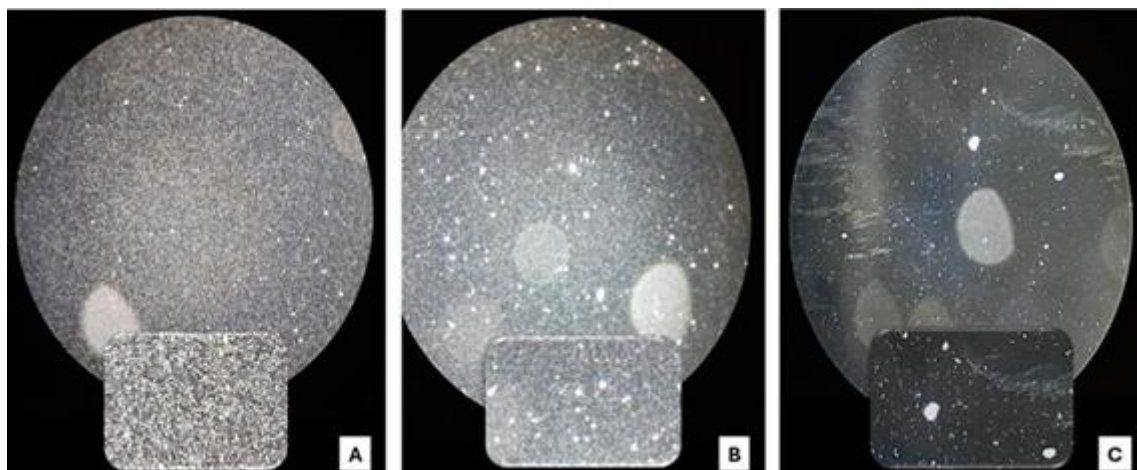
Secuencia de realización de una MAT



Nota. A y B: Preparación de la dilución de los sueros problemas en una dilución 1:50 con PBS. C: Carga de la placa de 96 pocillos con las diluciones iniciales de los sueros caninos. D: Carga del antígeno.

Figura 10.11

Lectura de una MAT en microscopio de fondo oscuro



Nota. A: Observación del testigo de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en microscopio de fondo oscuro 10 X. B: Muestra de suero canino no reactiva. C: Muestra de suero canino reactiva.

El diagnóstico temprano de la leptospirosis en pequeños animales es importante debido a la naturaleza zoonótica de la enfermedad y a la necesidad de iniciar un tratamiento adecuado en los caninos y felinos infectados. Además, al ser la leptospirosis un evento de denuncia obligatoria, la elección adecuada de las pruebas disponibles permite la confirmación de casos sospechosos y por lo tanto una correcta notificación de esta.

Referencias

- Ahmed, A., Engelberts, M. F., Boer, K. R., Ahmed, N. y Hartskeerl, R. A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PloS one*, 4(9), e7093.
- Koizumi N. (2020). Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2134, 277–287. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_25
- Koizumi, N. y Picardeau, M. *Leptospira* spp: Methods and Protocols. 1st ed. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5>
- Korba AA, Lounici H, Kainiu M, Vincent AT, Mariet JF, Veyrier FJ, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira* ainlahdjerensis sp. nov., *Leptospira* ainazelensis sp. nov., *Leptospira* abararensis sp. nov. and *Leptospira* chreensis sp. nov., four new species isolated from water sources in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021 Dec;71(12).
- Martin, P. L., Stanchi, N. O., Brihuega, B. F., Bonzo, E., Galli, L. y Arauz, M. S. (2019). Diagnosis of canine leptospirosis: evaluation of two PCR assays in comparison with the microagglutination test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, (39), 255-262.
- Ministerio de salud. Gobierno de la provincia de Buenos Aires (2020). *Normativa de notificación de enfermedades de denuncia obligatoria en veterinaria en pequeños animales*. <https://cvpba.org/enol/>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., y Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007270.

CAPÍTULO 11

Micobacteriosis

Pedro Sebastián Sosa, Fiorella Alvarado Pinedo y Gabriel Eduardo Travería

Las micobacteriosis en caninos y felinos son producidas por bacterias del género *Mycobacterium*, cuya relevancia radica en que son potencialmente zoonóticas y pueden causar tuberculosis en los humanos. El vínculo humano-animal, formas de alimentación y hábitos de caza, generan un contexto epidemiológico favorable para su presentación. Su baja incidencia, signos clínicos inespecíficos y desconocimiento de esta hacen que con frecuencia no se incluya como diagnóstico diferencial en la clínica veterinaria. El objetivo de este capítulo es describir los principales aspectos de su abordaje diagnóstico, sus manifestaciones clínicas en animales de compañía y revisar las recomendaciones para el manejo de los animales sospechosos de micobacteriosis.

Micobacterias

Las bacterias del género *Mycobacterium*, son bacilos, aerobios, inmóviles, intracelulares facultativos, poseen capacidad de sobrevivir en los macrófagos, no presentan esporos, cápsula o toxinas y en general son de crecimiento lento, con requerimientos estrictos para su desarrollo. Son conocidos como BAAR (bacilo ácido-alcohol resistente) debido a la presencia de ácidos micólicos y lípidos complejos en su pared, que le dan resistencia a la decoloración con alcohol ácido, cuando se colorean con la tinción de Ziehl Neelsen. Las micobacterias que afectan a pequeños animales se pueden agrupar en tres: el complejo *M. tuberculosis* (CMT), el complejo *M. avium* (CMA) y un tercer grupo, micobacterias ambientales no tuberculosas (MNT). Los dos primeros son los de mayor importancia en animales domésticos, de producción pecuaria y en el humano.

Epidemiología

Las infecciones por micobacterias en animales de compañía son un riesgo potencial para el ser humano. Depende de la especie de micobacteria, la proximidad del contacto animal-

propietario y el estado inmunitario, entre otros factores. *Mycobacterium tuberculosis* es la principal causa de tuberculosis en humanos y puede afectar a perros, comportándose como una antroponosis. Mayormente los casos se asocian a hábitos de caza de roedores, consumo de leche o carne/vísceras crudas. En felinos, las vías de contagio pueden ser digestiva, aerógena y en ocasiones a través de heridas cutáneas provocadas durante la lucha, a partir de las que se disemina en forma hematógena. Es común la infección con *Mycobacterium bovis* por consumo de dietas crudas y BARF (*Biologically Appropriate Raw Food*) o en caninos y felinos que viven en establecimientos de producción láctea. Es fundamental identificar la especie de micobacteria implicada, tipificarla y determinar su patrón de sensibilidad a antimicrobianos. Esto permitirá adoptar medidas terapéuticas adecuadas y evidenciar la posible cadena epidemiológica.

Micobacteriosis felina y canina

En felinos se distinguen tres presentaciones: la tuberculosis, causada generalmente por *M. bovis*, *M. microti* y rara vez por *M. tuberculosis*, por ser considerados resistentes a este último; la lepra felina cuyo agente compartido con roedores es el *M. lepraemurium* y otras micobacteriosis con manifestaciones cutáneas no lepromatosas generadas por MNT. Las presentaciones clínicas son variadas, y comorbilidades como VIF (Virus de inmunodeficiencia felina) y VILEF (Virus de leucemia felina) predisponen su padecimiento debido a una inmunidad celular comprometida. *M. bovis* es la especie de aislamiento más frecuente en micobacteriosis sistémicas. La signología clínica en la tuberculosis felina es inespecífica, incluye anorexia, fiebre, pérdida de peso, linfomegalia. Al ser una enfermedad ganglionar, sus otras manifestaciones se asocian al sitio de localización de los granulomas, siendo muy común la afección de los linfonodos mesentéricos, con consecuente efusión abdominal, diarreas, vómitos entre otros signos; Se han reportado efusiones pleurales-pericárdicas, uveítis, fracturas espontáneas, infecciones osteo-articulares. Las MNT se presentan como una inflamación subcutánea antes de diseminarse. Las infecciones por *M. avium* son raras, aunque hay razas como el siamés con mayor predisposición, ocasionando lesiones granulomatosas generalizadas indistinguibles de *M. tuberculosis* o *M. bovis*.

En caninos, *M. bovis* y *M. avium* son las especies más aisladas. A diferencia de los felinos es más probable la infección con *M. tuberculosis*, sobre todo en perros que han tenido contacto con personas infecciosas. Las presentaciones incluyen formas cutáneo ganglionar, pulmonar y diseminada. La lesión cutánea son nódulos alopecicos firmes, no pruriginosos e indoloros y bien circunscritos, que pueden o no ulcerarse. Se suelen localizar en nariz, labios, mentón, párpados, pliegue dorsal del pabellón auricular. La tuberculosis pulmonar se presenta con pérdida de peso, anorexia, fiebre, tos persistente y disnea en los cuadros más avanzados. En tuberculosis diseminada los síntomas se presentan en base al sistema afectado, ampliándose de esta manera la lista de posibles diagnósticos diferenciales. Se reportaron cuadros cardíacos,

hepáticos, neurológicos, entre otros. El agente productor de la tuberculosis aviar, *M. avium*, se identificó como causal de diarreas crónicas en caninos, similar a la paratuberculosis en rumiantes; sociado a una posible susceptibilidad de las razas Schnauzer y Basset Hound.

Diagnóstico

El diagnóstico en micobacteriosis no suele ser sencillo, en un principio la enfermedad tiene un curso subclínico y sus manifestaciones incipientes son poco orientativas y comunes a muchas otras noxas. Se suelen tener en cuenta después de tratamientos ineficaces contra otras patologías. En su abordaje diagnóstico es importante realizar una anamnesis minuciosa con la finalidad de recabar información sobre la raza, la alimentación, los hábitos del animal, lugar de residencia, convivencia con otras especies, entre otros datos. Los diagnósticos diferenciales deberían de incluir otras infecciones granulomatosas, dermatopatías, complejo granuloma eosinófilo, linfadenopatía, erlichiasis, enfermedad inflamatoria intestinal, PIF (Peritonitis Infecciosa Felina), afecciones oncológicas como linfomas, VIF-VILEF. Podemos dividir los métodos diagnósticos en directos, que detectan al agente causal, e indirectos, que detectan la respuesta inmune que este último genera en el hospedador.

Figura 11.1

Lesiones cutáneas y oculares en felinos y caninos



Nota. A, B y C: paciente felino, macho de aproximadamente 2 años de edad, el mismo presentaba úlceras en la piel de la cara y región sacra, artritis y pérdida de peso. D: BAAR, correspondientes a la citología efectuada en este caso. E: Canino con granuloma leproide en nariz. F: Canino raza pit bull, con lesiones ulcerativas en la base

del pabellon auricular, compatible con granuloma leproide. Fotografías adaptadas con permiso, gentileza de los MV. Arroyo Franco (A, B, C y D), Cravero Mariano (E) y Peralta Mario (F).

Toma de muestras

Se pueden obtener muestras por raspado de lesiones cutáneas o biopsias, punción aspiración con aguja fina (PAAF) de linfonodos afectados; punción eco guiada o durante laparotomía exploratoria de linfonodos mesentéricos, hisopados y lavados bronco-alveolares, para posteriormente realizar sobre estas matrices la baciloscopia, aislamiento y PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

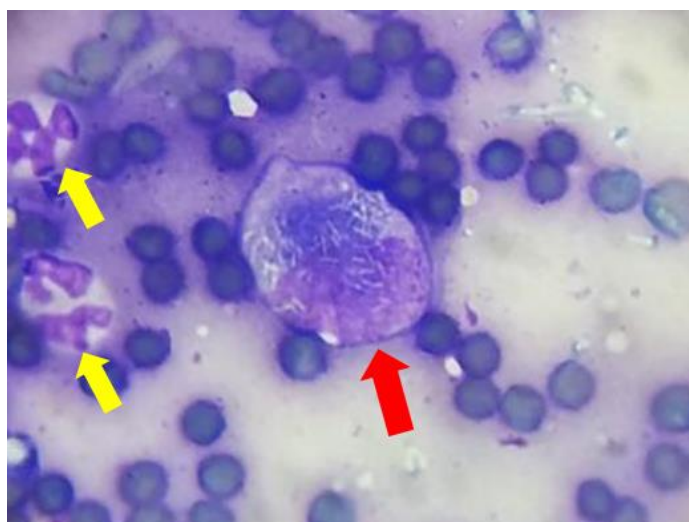
Métodos directos

Citología

El examen citológico, revela una reacción piogranulomatosa con neutrófilos, macrófagos y células gigantes. La tinción tipo Romanowsky (Tinción15®, Diff-Quick®, Wright, May Grünwald/Giemsa) usualmente aplicada en citología no colorea micobacterias, por lo tanto los bacilos no teñidos, intra o extracelulares, se ven formando negativos o "fantasmas" (Figura 11.2).

Figura 11.2

Tinción 15 de impronta de lesión cutánea



Nota. Se observan bacilos no teñidos en el interior de un macrófago (Flecha roja) y presencia de neutrófilos (Flechas

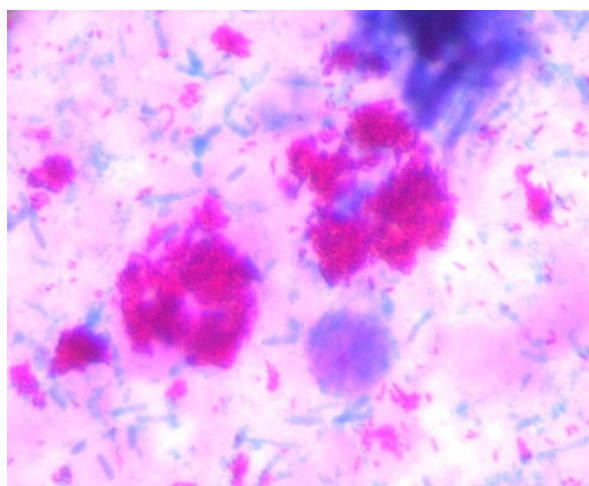
amarillas). Citología característica de la inflamación piogranulomatosa. Fotografía adaptada con permiso, gentileza del MV. Franco Arroyo.

Tinción de Ziehl Neelsen (ZN)

Como ventaja la coloración de ZN es relativamente sencilla, se puede realizar en la clínica veterinaria; sobre material aspirado, improntas de órganos y raspados cutáneos entre otros. Su sensibilidad puede variar, siendo menor en lesiones paucibacilares (pocos bacilos). Sobre el extendido fijado con calor, se aplica fucsina de Ziehl como colorante primario, se calienta para favorecer su penetración durante unos 5 minutos, posteriormente se decolora con alcohol-ácido, se enjuaga bien y se añade como contraste azul de metileno. Toda célula que haya sido decolorada toma color azul, mientras que las micobacterias son BAAR y conservan el color fucsia (Figura 11.3).

Figura 11.3

Tinción de Ziehl Neelsen. Observación microscópica de BAAR



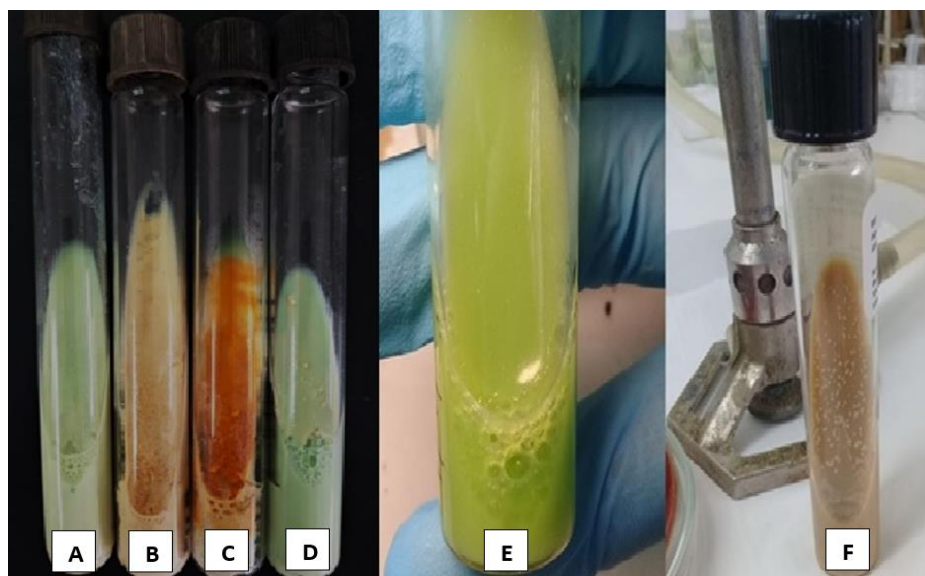
Cultivo

Las bacterias pertenecientes al CMT y el CMA por lo general son de crecimiento lento, requieren periodos de incubación prolongados, entre una semana hasta tres meses, al contrario, las MNT son de crecimiento rápido, llegando a desarrollarse antes de una semana de incubación. Se suelen realizar descontaminaciones como la de Petroff sobre las muestras con la finalidad de limitar el desarrollo de contaminantes. Los medios de cultivo utilizados incluyen yema de huevo como el medio de Herrold; el Stonebrink suplementado con piruvato, preferente para el cultivo de *M. bovis* y Löwenstein Jensen, suplementado con glicerol, preferencial para *M. tuberculosis* y otras micobacterias (Figura 11.4). Es importante sembrar el inóculo en ambos medios ya que desconocemos que micobacteria es la implicada. Muchas

veces, los tiempos de cultivo no acompañan a la urgencia del caso, pero su importancia radica en que a partir del aislamiento se podría realizar la tipificación, la cual nos ayuda a comprender la cadena epidemiológica y de ser efectuada, a tomar decisiones preventivas y terapéuticas adecuadas.

Figura 11.4

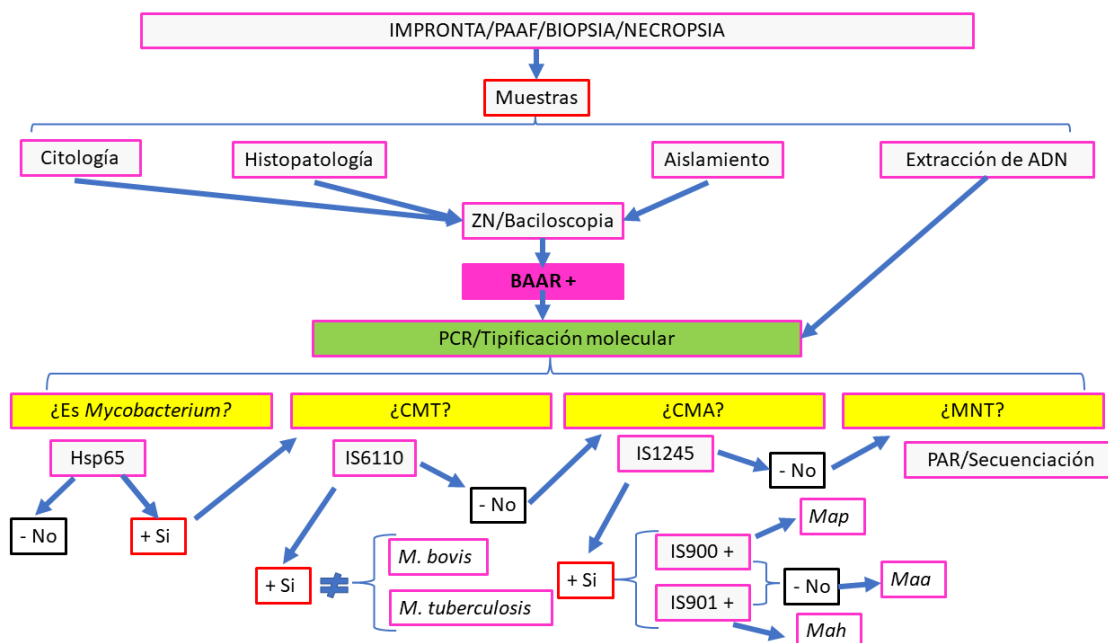
Medios de cultivo Löwenstein Jensen y de Herrold para el aislamiento de micobacterias



Nota. Medio Löwenstein Jensen. A: sin sembrar; B: *M. smegmatis*, color beige; C: *M. phlei*, color naranja; D: *M. avium* subsp. *avium*. E: Medio de Herrold: sin sembrar y F: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Técnicas moleculares y tipificación

Las técnicas moleculares se basan en la identificación de ADN micobacteriano, se pueden efectuar sobre muestras biológicas o sobre el aislamiento. Son más rápidas, pero más costosas, por lo tanto, menos accesibles para los propietarios. Como ejemplo, mediante la PCR se amplifica un segmento diana de ADN de forma tal que se vuelve visible en una electroforesis posterior a la reacción, este segmento es seleccionado utilizando cebadores específicos para complejo, género, o especie según cuál sea el objetivo de nuestra tipificación. Inicialmente se deberían utilizar para la diana *Hsp65*, la misma nos sirve para identificar el género, posteriormente, para saber si la micobacteria implicada pertenece al CMA, se amplifica el segmento de inserción IS1245 o el CMT IS6110. En el caso de que la misma pertenezca al CMT, habría que tipificar con cebadores para una diana especie específica con la finalidad de saber si es *M. tuberculosis* o *M. bovis* (Figura 11.5), implicadas como productoras de tuberculosis en el ser humano.

Figura 11.5*Flujograma diagnóstico y tipificación molecular de micobacteriosis*

Nota. PAAF: punción aspiración con aguja fina; ZN: tinción de Ziehl Neelsen; BAAR: bacilo ácido alcohol resistente; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; CMT: Complejo *M. tuberculosis*; CMA: Complejo *M. avium*; MNT: Micobacterias no tuberculosas. Hsp: proteínas de choque térmico; IS: segmento de inserción; Map: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; Maa: *M. avium* subsp. *avium*; Mah: *M. avium* subsp. *hominissuis*; PAR: análisis de polimorfismo de restricción.

Métodos indirectos

Intradermorreacción con derivado proteico purificado (PPD)

La intradermorreacción con PPD es poco útil en pequeñas especies. En lo que respecta a Interferón gamma y las serologías, actualmente en la República Argentina no se cuenta con kit diagnósticos de ELISA o prueba de interferón gamma validadas para su uso en animales de compañía.

Métodos de diagnóstico por imágenes

Como complemento en cuadros con manifestaciones sistémicas, son útiles los diagnósticos por imagen, para orientarnos en la toma de muestra y el abordaje diagnóstico. La

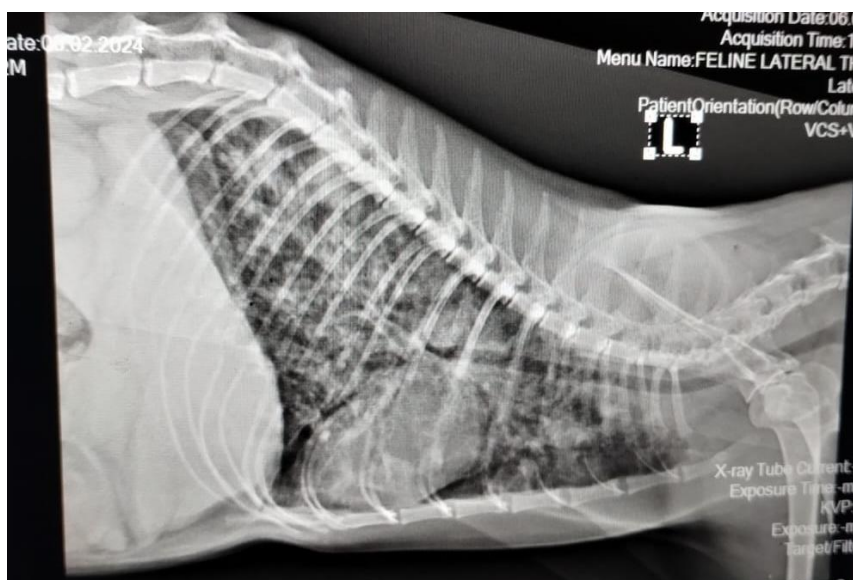
ultrasonografía permite evaluar la presencia de ascitis, hidrotórax, hepato-esplenomegalia, presencia de masas y linfomegalia en cavidades.

Las tomas de muestras mediante punción ecoguiada se realizan bajo anestesia-sedación.

La radiografía de tórax indicada en animales con disnea o tos frecuente pueden evidenciar un patrón intersticial difuso si la diseminación de las micobacterias es por vía sanguínea desde la piel con el progreso hacia bronquial. En los casos de tuberculosis cuyo ingreso es por vía aerógena, se distingue un patrón nodular multifocal (Figura 11.6).

Figura 11.6

Radiografía de tórax en felino



Nota. El patrón nodular multifocal se puede presentar en otras patologías pulmonares como neoplasias pulmonares primarias/metástasis, PIF, aspergilosis. Incidencia latero-lateral. Fotografía adaptada con permiso, gentileza del MV Víctor Magallanes.

Necropsia/histopatología

En animales de compañía no siempre se accede a la realización de la necropsia, ya que, por parte de los tutores, no es un método que sea bien aceptado. La importancia radica en el estudio en profundidad del caso, la obtención de muestras que nos permitan evidenciar tanto los hallazgos macroscópicos e histopatológicos, como el aumentar la probabilidad de concretar un aislamiento. Este último, es de importancia para informar a los propietarios con mayor

certeza, a fin de que si es necesario consulten a su médico y se efectúen pruebas diagnósticas para monitorear su estado de salud.

¿Qué se hace con un animal enfermo?

Tratamiento bajo consentimiento escrito del animal con diagnóstico confirmado, si no es posible, tratar de sugerir la eutanasia.

En caso de convivir con un animal diagnosticado o sospechoso de tuberculosis se debe concurrir al médico del centro de salud más cercano para que determine los pasos a seguir en relación a las personas expuestas.

Referencias

- Baraboglia, E.R. (2009). Enfermedades Infecciosas Micobacteriosis Atípicas. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 10(10), 1-49.
- Borrás, P., Marfil, M.J., Tellado, M., Hernandez, D., Osacar, J.M., Piras, I. y Barandiaran, S. (2022). *Mycobacterium avium* in Miniature Schnauzer From Argentina: A Series of Cases. *Topics in Companion Animal Medicine*, (51), 100698.
- Gay, G., Burbidge, H.M., Bennett, P., Fenwick, S.G., Dupont, C., y Murray, A. (2000). Pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *New Zealand Veterinary Journal*, 48(3), 78-81.
- Guil-Luna, S., Cardoso-Toset, F., Gómez-Gascón, L., Ruiz, P., De Andrés, J., Luque, I., Millán, Y. (2014) Micobacteriosis fatal en perros Schnauzer miniatura co-sanguíneos. Primera descripción en España. *Revista oficial de la Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales, AVEPA*, 34(2): 15 – 19.
- Gunn-Moore, D. (2019). Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in pet cats associated with feeding a commercial raw food diet. *Journal of feline medicine and surgery*, 21(8), 667–681. <https://doi.org/10.1177/1098612X19848455>
- Horn, B., Forshaw, D., Cousins, D., y Irwin, P.J. (2000). Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a dog with chronic diarrhea. *Australian Veterinary Journal*, 78(5), 320-325.
- Jorge, M.C., Traversa, M.J., Schettino, D.M., y Sanz, H. (2010). Síndromes micobacterianos felinos y su importancia en la salud pública. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(1).
- Lalor, S.M., Clarke, S., Pink, J., Parry, A., Scurrrell, E., Fitzpatrick, N., Watson, F., O'Halloran, C., y Gunn-Moore, D. (2017). Tuberculosis joint infections in four domestic cats. *JFMS open reports*, 3(2), 2055116917719401. <https://doi.org/10.1177/2055116917719401>
- Marfil, M.J., Barandiaran, S., Zumárraga, M.J. (2022). *Mycobacterium tuberculosis* infection in a free-ranging urban dog from Argentina. *Vet Res Commun*, (46), 781–788. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09898-4>
- Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en Pequeños Animales (2020). Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires,

Departamento de Zoonosis Urbanas, Dirección de Epidemiología.

<https://cypba.org/wpcontent/uploads/2022/03/ENO-05-2020-1.pdf>

- O'Halloran, C., Ioannidi, O., Reed, N., Murtagh, K., Dettemering, E., Van Poucke, S., Gale, J., Vickers, J., Burr, P., Gascoyne-Binzi, D., Howe, R., Dobromylskyj, M., Mitchell, J., Hope, J., Posthaus, H., Bodmer, T., Alves, L., Oevermann, A., Schiller, I., Rhodes, S. G., & Zimmerli, S. (2011). Accidental infection of veterinary personnel with *Mycobacterium tuberculosis* at necropsy: a case study. *Veterinary microbiology*, 149(3-4), 374-380.
- Rocha, V. C. F., Figueiredo, S. C. D., Rosales, C. A. R., Porto, C. D., Sequeira, J. L., Ferreira, J. S., Salgado, V. R. (2017). Infection by *Mycobacterium bovis* in a dog from Brazil. *Brazilian journal of microbiology*, (48), 109-112.
- Szaluś-Jordanow, O., Augustynowicz-Kopeć, E., Czopowicz, M. (2016). Intracardiac tuberculomas caused by *Mycobacterium tuberculosis* in a dog. *BMC Vet Res*, (12), 109. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0731-7>

CAPÍTULO 12

Hemobacterias

Paula Lorena Martín y Florencia Vinocur

Introducción

Las enfermedades bacterianas transmitidas por vectores en pequeños animales constituyen un grupo de afecciones con importancia en la sanidad y el bienestar animal debido a que pueden ocasionar cuadros que comprometen la vida de los pacientes afectados o pueden estar asociadas a infecciones no clínicas u ocultas a largo plazo, actuando como fuente de infección para otros hospedadores susceptibles. Por otra parte, la mayoría de estas enfermedades pueden producir alteraciones clínico-patológicas similares, por lo que resulta importante confirmar el caso clínico y determinar la presencia de coinfecciones, particularmente en áreas endémicas, las que podrían dificultar el diagnóstico o agravar el cuadro del paciente. Dentro de este grupo, la ehrlichiosis monocítica canina, la anaplasmosis infecciosa canina y la micoplasmosis felina representan los procesos bacterianos patológicos más frecuentes en nuestra región, por lo cual en este capítulo se describirán los métodos de diagnóstico directo e indirecto de estas hemobacterias en pequeños animales.

Ehrlichiosis monocítica canina y anaplasmosis

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y anaplasmosis canina (AC) o trombocitopenia cíclica infecciosa son enfermedades causadas por bacterias gramnegativas del orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, género *Ehrlichia* y *Anaplasma*.

Ehrlichia canis es una bacteria intracelular obligada, cocoide o pleomórfica, que invade las células sanguíneas de la serie leucocítica, principalmente monocitos/macrófagos, formando grupos de organismos llamados mórulas en el interior del citoplasma. La detección de mórulas en otros tipos de leucocitos es poco común, aunque se reportó en neutrófilos.

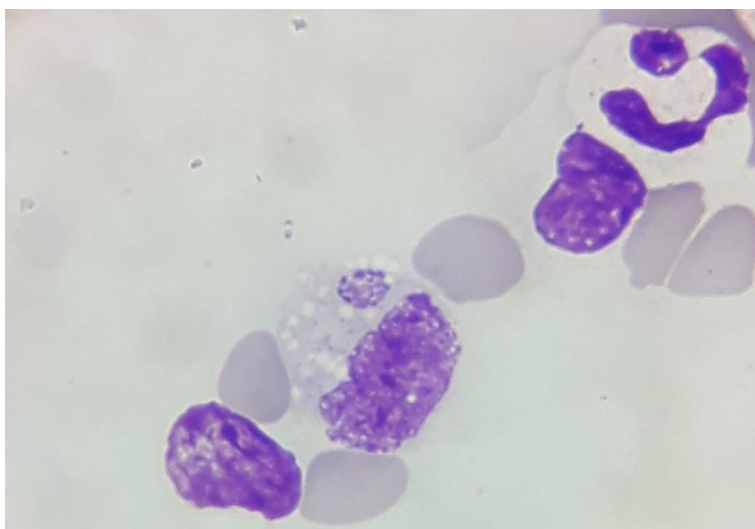
Anaplasma platys, puede ser bacilar, cocoide o pleomórfica y en el hospedador vertebrado invade las plaquetas y se presenta en el interior del citoplasma en 1 a 3 vacuolas únicas, revestidas de membrana con 1 a 15 organismos por vacuola. La fisión binaria repetida de los microorganismos dentro de la vacuola da como resultado la formación de una mórula.

Diagnóstico

El diagnóstico de EMC y AC puede realizarse en forma directa mediante la detección del agente o su ADN. En el primer caso, la realización de extendidos de sangre periférica y posterior tinción con MayGrunwald-Giemsa o Metanol-Giemsa permite la visualización de estructuras compatibles con mórulas (Figura 12.1). Desafortunadamente, la búsqueda de mórulas es difícil, requiere tiempo y presenta baja sensibilidad. Además, las plaquetas, los gránulos azurófilos linfocíticos y el material nuclear fagocitado pueden confundirse con inclusiones.

Figura 12.1

Extendido sanguíneo teñido con metanol-Giemsa de un canino con sospecha de EMC



Nota. Monocito reactivo y en su interior una estructura basófila compatible con mórulas de *E. canis*. Magnificación 1000 X

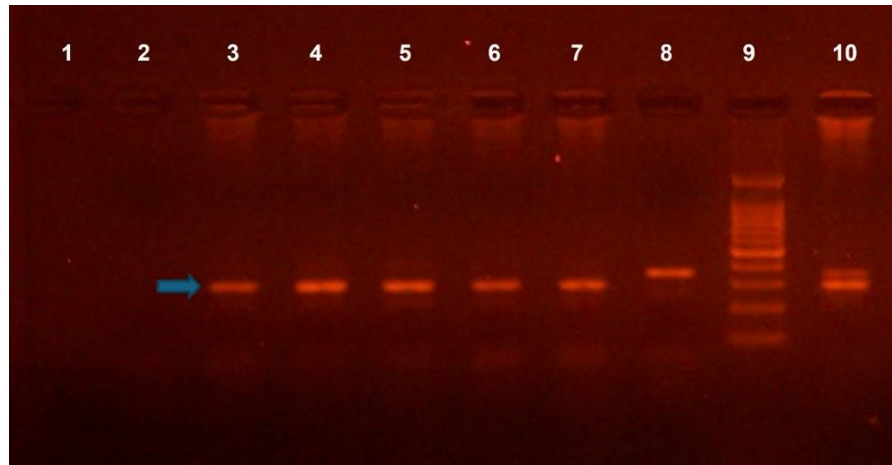
En relación con la detección molecular del agente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, PCR) constituye una prueba sensible para la confirmación temprana de los casos tanto de EMC como de AC. Hasta el momento se publicaron numerosos ensayos de PCR basados en la amplificación de diferentes fragmentos génicos (16S ARNr, *p28*, *p30*, *dsb*, *VirB9*; *groESL*) que permiten detectar familia, género o especie aplicando protocolos de PCR punto final o en tiempo real. En la Figura 12.2 se muestra una prueba de PCR punto final para la identificación de un fragmento del 16S ARNr de familia *Anaplasmataceae*.

Por otra parte, dentro de las pruebas serológicas existen métodos cualitativos como las pruebas rápidas (Figura 12.3) y otros cuantitativos, como la Inmunofluorescencia indirecta.

En la interpretación de los resultados con estas pruebas se debe recordar que los anticuerpos pueden persistir por tiempo prolongado y que la sola presencia de un resultado positivo no es inherente a enfermedad actual, principalmente en aquellas regiones donde existe una alta prevalencia.

Figura 12.2

Gel de agarosa de la PCR 16S ARNR de familia Anaplasmataceae



Nota. Calle 1 control negativo de la PCR. Calle 2: control negativo de extracción de ADN. Calle 3 a 7: muestras negativas. Calle 8: control positivo de PCR. Calle 9: marcador de peso molecular de ADN 100pb. Flecha azul: banda correspondiente al control endógeno de beta-actina.

Figura 12.3

Prueba inmunocromatográfica para diagnóstico serológico de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*



Nota. UranotestR. A: Prueba positiva para *E. canis* y *A. platys*. B: Prueba positiva para *E. canis* y negativa para *A. platys*.

Micoplasmosis felina

Esta enfermedad es producida por bacterias hemotrópicas del género *Mycoplasma* (orden *Mollicutes*, familia *Mycoplasmataceae*). Bacterias pleomórficas debido a la falta de pared celular, sin embargo, la forma típica en la mayoría de las especies es cocobacilos de un tamaño de 0,2 a 0,4 μm de diámetro. También pueden encontrarse en forma de cadenas que se extienden a lo largo de la superficie de los eritrocitos en los frotis sanguíneos.

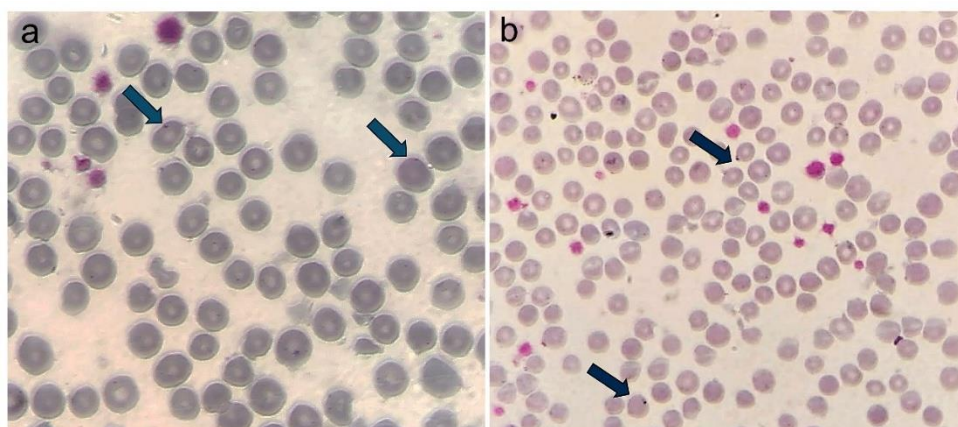
Diagnóstico

Los microorganismos se pueden observar mediante observación en frotis teñidos con May-Grünwald Giemsa, en microscopio óptico a 100 X (Figura 12.4). Se deben examinar frotis frescos, ya que el organismo puede desprenderse de los eritrocitos en presencia de ácido etilendiaminotriacético (EDTA). Los diagnósticos falsos positivos se producen cuando los precipitados de la tinción, el punteado basófilo y los cuerpos de Howell-Jolly se confunden con los microorganismos.

Por otro lado, el diagnóstico puede realizarse mediante la prueba de PCR punto final o en tiempo real, generalmente basadas en la amplificación de un fragmento gen ARNr 16S. Se ha demostrado que estos ensayos son significativamente más sensibles que la evaluación del frotis sanguíneo.

Figura 12.4

Frotis de sangre periférica teñido con metanol-giemsa



Nota. Formas cocoides basófilas compatibles con micoplasmas hemotrópicos. Magnificación 1000 X.

Referencias

- Harrus, S. y Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 187(3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Harrus S, Waner P, Mark Neer T. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections. En Greene (Edición 4th) *Infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 227-259). Editorial Elsevier.
- Mascarelli, P. E., Tartara, G. P., Pereyra, N. B., y Maggi, R. G. (2016). Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites & vectors*, 9(1), 642. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1920-8>
- Sykes J. E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *Journal of veterinary emergency and critical care* (San Antonio, Tex.: 2001), 20(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00491.x>

CAPÍTULO 13

Clamidiosis

Javier Aníbal Origlia

Introducción

La familia *Chlamydiaceae* comprende un importante grupo de **bacterias intracelulares obligadas** que son patógenas relevantes para la salud pública y animal, causando una variedad de enfermedades crónicas o agudas. Actualmente, en el género *Chlamydia* se agrupan 15 especies: *C. abortus*, *C. avium*, *C. buteonis*, *C. caviae*, *C. crocodili*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. poikilotherma*, *C. serpentis*, *C. psittaci*, *C. suis* y *C. tracomatis*; además, existen varias especies propuestas o candidatas como *Candidatus Chlamydia ibidis*, *Ca. C. coralli*, *Ca. C. sanzinae*, *Ca. C. testudini*.

Recientemente, fue propuesto el nuevo género *Chlamydiifrater* dentro de la familia, en el cual se reconocen dos especies aisladas del aparato digestivo de flamencos en cautiverio en Francia: *Chlamydiifrater phoenicopteri* sp. nov. y *Chlamydiifrater volucris* sp. nov.

Por su estructura, son bacterias gramnegativas, aunque no se colorean con la tinción de Gram, son intracelulares obligadas y poseen un ciclo de reproducción bifásico con la formación de cuerpos elementales (CE) y cuerpos reticulares (CR). Los CE tienen forma esférica y un tamaño de 0,2 a 0,4 μm y representan las formas infecciosas, extracelulares y no activas metabólicamente. Los CR son las formas intracelulares metabólicamente activas con un diámetro de 0,5 a 2 μm . El ciclo se inicia cuando un CE se une a un receptor específico de una célula eucariota susceptible y es internalizado por endocitosis. Luego de entrar en la célula, la vacuola endocítica evade la fusión con los lisosomas, por lo cual no es degradada y el ciclo continúa. El CE dentro de la vacuola evoluciona a una forma laxa denominada CR, en este tiene lugar la síntesis de macromoléculas. En condiciones favorables, CR, se divide por fisión binaria y genera un crecimiento poblacional logarítmico, para luego convertirse nuevamente en CE que son liberados fuera de la célula huésped por lisis o exocitosis.

Estos microorganismos están rodeados por una pared celular que es similar a la de las bacterias gramnegativas, pero carece de peptidoglicano. Está formada por una membrana externa y una membrana interna. La membrana externa se compone de fosfolípidos, lípidos, lipopolisacáridos y proteínas. Se puede encontrar al lipopolisacárido (LPS) que es un antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. El LPS clamidial presenta reacción cruzada en las pruebas serológicas, no solo entre los distintos miembros de

la familia *Chlamydiaceae*, sino también con algunos de los LPS de las cepas rugosas de ciertas enterobacterias.

Dentro de las proteínas de membrana externa la MOMP (principal proteína de membrana externa) es el antígeno dominante y está expuesta en la superficie de la membrana, por lo tanto es muy inmunogénica. Esta proteína funciona como una porina y consta de 5 dominios transmembrana conservados (CDI-V) y 4 dominios variables (VDI-IV) que están expuestos en la superficie externa. Los dominios VDI, VDII y VDIV son donde se localizan los epítopes reconocidos por los linfocitos B. El gen *ompA* que codifica la proteína es altamente polimórfico y específico del género *Chlamydia*, con aproximadamente el 30 % de la secuencia atribuida a polimorfismos de nucleótidos y/o recombinación. Este gen es un marcador ampliamente utilizado para estudios clínicos, epidemiológicos, filogenéticos y de salud pública.

Las clamidias requieren células vivas para su propagación y suelen cultivarse en huevos embrionados de gallina o en cultivos celulares. Debido a la naturaleza tediosa de este grupo bacteriano, el diagnóstico serológico (indirecto) es muy valioso. En los últimos años, el uso clínico de la PCR mejoró la capacidad de diagnóstico directo de clamidiosis.

Las clamidias pueden producir infecciones inaparentes o evidentes en una amplia variedad de hospedadores. Persisten en las mucosas ocular, respiratoria, gastrointestinal y genitourinaria y se propagan directamente entre hospedadores a través del contacto o aerosoles y solo sobreviven unos pocos días en el ambiente a temperatura ambiente. La inmunidad a estos organismos involucra mecanismos celulares y humorales. La tendencia a causar infecciones crónicas, recurrentes o latentes, indica que solo se provoca una respuesta inmunitaria parcial del huésped.

En gatos, *C. felis* es la principal especie descrita causando conjuntivitis y enfermedad respiratoria superior. La detección de anticuerpos positivos para clamidias varía del 11 % en gatos sanos al 45 % en gatos enfermos o aquellos provenientes de criaderos o refugios. Tanto en las prevalencias basadas en el aislamiento del agente como en la detección por PCR también se observa un mayor porcentaje de positivos cuando las muestras provienen de gatos con conjuntivitis. Existen estudios serológicos en gatos combinados con cultivo o detección molecular que indican que la probabilidad de exposición y aumento de la inmunidad son mayores con la edad. Los gatos de 2 a 6 meses de edad tienen probabilidades de estar infectados con *C. felis*, al igual que los gatos de hasta 1 año. Posteriormente, la prevalencia de la infección disminuye y es muy poco probable que los gatos mayores de 5 años se infecten con *C. felis*. Los gatos menores de 8 semanas de edad tienen menos probabilidades de infectarse, probablemente debido a la inmunidad pasiva derivada de la lactancia. Se cree que un modo primario de transmisión de la infección en los gatitos neonatos es a través de las mucosas genitales de la madre durante el parto. En los gatos mayores, la transmisión se produce por contacto directo o por aerosol cercano y aún no hay evidencia de transmisión venérea, como se describe en otros hospedadores.

Hay poca información disponible sobre la epidemiología de las infecciones por clamidia en perros. Se identificaron las especies *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. cavia* y *C. felis*. Las infecciones

por clamidias en perros se asocian a casos de neumonía atípica, queratitis, conjuntivitis y abortos.

Un estudio en Europa determinó que, si bien el 2,04 % de sueros de perros callejeros fueron positivos a *C. psittaci*, no se detectó la presencia de la bacteria. Otro estudio, basado en la detección de antígeno clamidial por medio de inmunofluorescencia directa en perros enfermos con signos urogenitales, lesiones conjuntivales, signos urogenitales y conjuntivales y otros signos, demostró una prevalencia general del 61,9 %, siendo mayor en aquellos que presentaban lesiones conjuntivales o signos urogenitales y lesiones conjuntivales juntos.

Para el diagnóstico presuntivo de clamidiosis en pequeños animales, se combinan los datos obtenidos en la anamnesis, el examen físico, estudios hematológicos y bioquímica clínica; la confirmación se puede realizar mediante el diagnóstico serológico (indirecto) o diagnóstico directo (aislamiento bacteriano, observación microscópica o aplicación de técnicas moleculares). Debido a que las pruebas disponibles pueden tener ciertas limitaciones en su aplicación, para arribar al resultado final, se recomienda la combinación de ambos tipos de diagnóstico.

En este capítulo se describirán los métodos de diagnóstico directo e indirecto de la clamidiosis en pequeños animales.

Diagnóstico por métodos directos

Toma y conservación de la muestra

Los aislamientos de clamidias en gatos suelen obtenerse con mayor frecuencia a partir de hisopados conjuntivales, aunque también se utilizaron nasales, faríngeos, rectales y vaginales. Para obtener suficientes células epiteliales que contengan las bacterias, es fundamental realizar un frotado vigoroso con el hisopo sobre las superficies mucosas.

Posteriormente, los hisopos deben colocarse inmediatamente en un medio de transporte para clamidias, como 2-SP, medio SPG o UTM (Medio universal de transporte para Virus, *Chlamydia* y *Mycoplasma*) y refrigerarse a 4 °C. Si el envío al laboratorio no se realiza de inmediato, lo ideal es hacerlo dentro de las 24 horas posteriores a la recolección. Las muestras pueden congelarse a -80 °C; debe considerarse que esto puede provocar la pérdida de algunos organismos y, en consecuencia, resultados de prueba falsos negativos.

Aislamiento e identificación bacterianos

Como las clamidias son intracelular obligadas, el aislamiento a partir de muestras clínicas debe realizarse en huevos embrionados, cultivos celulares (líneas Vero, BGM, McCoy o células L) y en menor medida, en animales de laboratorio.

Debido a las características zoonóticas de muchas de las clamidias involucradas en las infecciones de perros y gatos, para el aislamiento es necesario disponer de instalaciones de bioseguridad de nivel 3.

El cultivo es necesario para demostrar la viabilidad de una cepa de campo y también facilita la caracterización detallada mediante métodos moleculares y bioquímicos, por lo cual es utilizado mayormente con fines de investigación y es de extrema importancia desde el punto de vista epidemiológico.

La confirmación del diagnóstico debe ser realizada por tinciones de rutina, generalmente Giemsa, o inmunohistoquímica de las células infectadas o mediante métodos moleculares.

Diagnóstico rápido por detección de antígenos

El diagnóstico rápido de una infección por clamidia puede realizarse a partir de extensos de muestras clínicas adecuadas, utilizando tinciones como Giemsa, Macchiavello modificada o Giménez modificada, entre otras. También se pueden utilizar pruebas de inmunofluorescencia directa con anticuerpos fluorescentes anti LPS o anti MOMP.

Los métodos de inmunohistoquímica se utilizan para evidenciar la presencia de clamidias en preparaciones histológicas y obtienen mejores resultados que las coloraciones histoquímicas.

Para la citología, se pasan hisopos conjuntivales por el fondo de saco conjuntival inferior y se extienden en portaobjetos de vidrio, se secan al aire y se fijan con acetona antes de teñirlos.

Las inclusiones intracitoplasmáticas compuestas por grupos de cuerpos cocoides (de 0,5 µm de diámetro) suelen tener un diámetro de 10 µm en las células epiteliales y son basófilos. Se debe tener en cuenta que pueden existir artefactos que se tiñen de manera similar (gránulos de melanina en el citoplasma de las células epiteliales conjuntivales) los que pueden producir resultados falsos positivos.

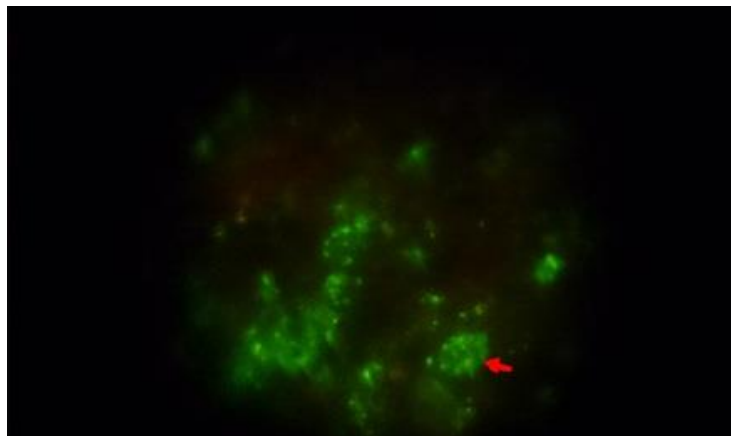
Hay que destacar que tanto las tinciones histoquímicas como las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencia directa informan la presencia de algún miembro del género *Chlamydia*, pero no la especie involucrada.

Existen ensayos inmunocromatográficos rápidos que pueden detectar el antígeno directamente en muestras de pacientes (hisopados conjuntivales, vaginales, entre otros). El desarrollo se basa en la detección del LPS, que es común a todas las especies de clamidias, por lo cual se produce una reacción cruzada entre todos los miembros del género. Debido a esto, para el diagnóstico de clamidiosis en pequeños animales, se utilizaron kits diagnósticos desarrollados para humanos o aves. Hay que tener en cuenta las limitaciones que conllevan ya que varían considerablemente en su sensibilidad además que presentan reacciones cruzadas con otras bacterias que pueden estar en las muestras y que fueron diseñados para ser usados en determinado tipo de muestras (por ejemplo, aquellos los diseñados para muestras genitales humanas que se utilizan en muestras conjuntivales felinas). En general, para detectar

infecciones en felinos, estas técnicas tienen menor sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos de diagnóstico como la PCR.

Figura 13.1

Inmunofluorescencia directa a partir de un hisopado conjuntival de gato



Nota. La flecha roja indica una inclusión intracitoplasmática de *Chlamydia* spp.

Detección molecular

Con la introducción de métodos moleculares, particularmente PCR, las posibilidades de detección rápida y de alta sensibilidad y especificidad de clamidias mejoró considerablemente. Las distintas técnicas moleculares permiten la identificación a partir de muestras clínicas, como así también la identificación de especie y la genotipificación. Los métodos convencionales de PCR, PCR anidada y PCR en tiempo real tienen como objetivo generalmente el operón de ARN ribosómico y el gen *ompA*, entre otros. Actualmente, son los métodos de elección para el diagnóstico y, debido a que distintas especies de clamidias pueden verse involucradas en los casos de pequeños animales, se recomienda un enfoque jerárquico para la detección e identificación del ADN de estas bacterias, que incluye una PCR de detección específica de *Chlamydiaceae* y, en casos positivos, seguida de PCR específicas de especie.

Distintos métodos como secuenciación parcial del gen *ompA*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), tipificación de secuencias multilocus (MLST) y la secuenciación de genoma completo (WGS) son utilizados para la tipificación de cepas para estudios epidemiológicos. La tecnología de *microarrays* (micro matrices de ADN) se encuentra validada y demostró ser de utilidad para el diagnóstico.

Diagnóstico indirecto

El diagnóstico indirecto de las infecciones por clamidias se realiza por serología, para lo cual se utiliza la fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta (IHA) la microinmunofluorescencia (MIF) y diversos ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). En nuestro país, la utilización de estos métodos suele ser limitada debido a su disponibilidad y en muchos casos, con fines diagnósticos, se reemplazaron por la detección molecular.

La detección de anticuerpos séricos contra clamidias presentó un beneficio diagnóstico limitado para determinar la infección activa porque el aumento del título de anticuerpos IgG es variable o prolongado y los títulos de anticuerpos IgM están elevados de manera inconsistente. La detección de títulos de anticuerpos altos generalmente se asocia a animales con signología clínica. Los animales seronegativos tienen menos probabilidades de ser portadores. Los títulos más elevados de anticuerpos se suelen correlacionar con una infección reciente y pueden corresponder con el aislamiento de *Chlamydia* en el animal clínicamente sano.

De todas formas, para la confirmación de una infección es necesario determinar el aumento en el título de anticuerpos por lo menos en dos sueros, obtenidos con una diferencia entre ellos de 2 o 3 semanas. Además, la vacunación reciente puede interferir con la interpretación de los resultados de títulos positivos.

Referencias

- Čengić, B., Ćutuk, A., Šatrović, E., Varatanović, N., Lindtner Knific, R., Slavec, B., Dovč, A. (2019). Research of Chlamydiosis presence in dogs population in Bosnia and Herzegovina. *Veterinarska stanica*, 50(6), 541-547.
- Liutkeviciene, V., Mockeliuniene, V., Sengaut, J., Salomskas, A., Stankeviciene, M., Mockeliunas, R. y Aleksejuniene, I. (2009). *Chlamydia* prevalence in sick dogs with urogenital and/or conjunctival lesions. *Revue de Médecine Vétérinaire*, (160), 547-551.
- Luu, L. D. W., Kasimov, V., Phillips, S., Myers, G. S. y Jelocnik, M. (2023). Genome organization and genomics in *Chlamydia*: whole genome sequencing increases understanding of chlamydial virulence, evolution, and phylogeny. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, (13), 1178736.
- Sprague, L. D., Schubert, E., Hotzel, H., Scharf, S. y Sachse, K. (2009). The detection of *Chlamydochlamydia psittaci* genotype C infection in dogs. *Veterinary Journal*, 181(3), 274-279.
- Sykes, J. E. (2022). *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Tian, Y. M., Cao, J. F., Zhou, D. H., Zou, F. C., Miao, Q., Liu, Z. L., Li, B.F., Lv, R.Q., Dub, X.P. y Zhu, X. Q. (2014). Seroprevalence and risk factors of *Chlamydia* infection in dogs in Southwestern China. *Acta Tropica*, (130), 67-70.

CUARTA PARTE

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

CAPÍTULO 14

Antibiograma

Fabiana Alicia Moredo

Las pruebas de sensibilidad, o antibiogramas, determinan el comportamiento de las bacterias frente a los antimicrobianos. Son imprescindibles para la implementación de una terapéutica dirigida que permita resultados exitosos y disminuya la diseminación de bacterias resistentes. Dado el contacto estrecho entre los animales de compañía y los humanos, es importante resaltar el uso de antimicrobianos y destacar la necesidad de seguir las recomendaciones de instituciones internacionales dedicadas al estudio de la resistencia antimicrobiana.

Uso prudente y responsable de antimicrobianos

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), en diversos documentos, define entre otras, como parte de las responsabilidades de los veterinarios, las de promover la sanidad y el bienestar animal, así como la salud pública, mediante la administración de antimicrobianos, la prevención, la detección, el diagnóstico y el control y el tratamiento de las enfermedades de los animales. Promover acciones que ayuden a reducir al mínimo la necesidad de utilizar antimicrobianos en animales.

El veterinario solo deberá recetar agentes antimicrobianos (ATM) para los animales de los que se ocupa y deberá considerar alternativas que sean seguras y eficaces al uso de ATM antes de realizar la prescripción.

El uso de ATM debe ser **prudente y responsable**. La prudencia se determina teniendo en cuenta la importancia de los ATM tanto para la medicina veterinaria como humana,⁸ el riesgo de desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (RAM), las especificaciones detalladas en la aprobación reglamentaria relevante y las indicaciones de uso previstas en la etiqueta, así como la prescripción fuera de indicación cuando se administran agentes antimicrobianos a los animales.

Los objetivos para el uso veterinario responsable y prudente de los ATM son:

⁸ WHO List of Medically Important Antimicrobials A risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/qcp/who-mia-list-2024-lv.pdf?sfvrsn=3320dd3d_2

- Preservar la eficacia de los ATM utilizados en medicina veterinaria y humana y su seguridad en los animales;
- Cumplir con la obligación ética y la necesidad económica de mantener a los animales en buen estado de salud;
- Prevenir o reducir la transferencia de microorganismos resistentes o determinantes de resistencia en el seno de las poblaciones animales, entre animales, humanos y en el entorno.

Con el fin de cumplir con los objetivos enunciados, deberá implementarse una serie de medidas destinadas a mejorar la sanidad y el bienestar animal, evitando o reduciendo al mismo tiempo la selección, aparición y propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos y determinantes de resistencia en los animales, los seres humanos y el entorno. Estas medidas incluyen procedimientos de higiene, bioseguridad, estrategias de vacunación, acceso a las pruebas de laboratorio y alternativas al uso de antimicrobianos, que puedan ayudar a minimizar la necesidad del uso de ATM en los animales.

Requisitos previos para el uso de antimicrobianos

La responsabilidad del veterinario es obtener un historial detallado y proceder a un examen clínico adecuado del animal, tomando las muestras correspondientes para la realización de pruebas de laboratorio. Si el diagnóstico provisorio y definitivo es una infección microbiana, el veterinario deberá:

- Recetar, dispensar o administrar ATM solo cuando sea necesario para tratar, controlar o prevenir las enfermedades infecciosas en los animales.
- Evitar el uso de ATM para compensar prácticas inadecuadas.
- Tomar en consideración la Lista de la OMSA de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria y seguir las directrices basadas en la ciencia para el uso de antimicrobianos según las especies o el sector, para el uso prudente y responsable cuando estén disponibles y seguir los principios de gestión de antimicrobianos.
- Seleccionar el ATM más apropiado, basándose en la experiencia clínica y la información obtenida disponible en el laboratorio de diagnóstico (aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana).
- Suministrar un protocolo detallado de tratamiento, incluyendo las precauciones y los periodos de suspensión (si se aplica), en particular al prescribir para usos distintos o adicionales a los que figuran en la etiqueta.
- Brindar una terapia de acompañamiento adecuada.

La elección de un tratamiento eficaz debería basarse en:

- La experiencia clínica del veterinario, su perspicacia diagnóstica y su juicio terapéutico.
- La información obtenida en el laboratorio de diagnóstico (aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana).

- La farmacodinámica, propiedades del ATM seleccionado, incluyendo la actividad contra los agentes patógenos considerados.
- La conveniencia del régimen de dosificación (es decir, dosis, frecuencia de la dosificación y vía y duración de la administración).
- La farmacocinética y distribución en los tejidos para tener la seguridad de que el producto terapéutico seleccionado es eficaz en el lugar de la infección.
- El historial epidemiológico adecuado para el animal tratado, en particular en lo relativo a los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de los patógenos considerados.

Ante el fracaso terapéutico o la recidiva de la infección, se llevará a cabo una investigación con el fin de reevaluar las circunstancias, incluida la revisión del diagnóstico, realizando pruebas adicionales, si es necesario, y luego formular e implementar un nuevo protocolo de tratamiento, que puede incluir o no otro ATM.

En **situaciones particulares**, y para evitar una presentación clínica compleja de una enfermedad, puede ser necesario que el veterinario implemente un tratamiento terapéutico de forma empírica, antes de disponer de los resultados del diagnóstico preciso y del antibiograma respectivo.

Al prescribir, dispensar o administrar un producto veterinario que contenga ATM destinados al uso veterinario de un individuo o de un grupo de animales con el fin de tratar, controlar o prevenir enfermedades infecciosas, el veterinario deberá tener en cuenta su categorización específica en la Lista de la OMSA de antimicrobianos de importancia veterinaria o las listas nacionales. Se deberá preferir el ATM de menor importancia, según la clasificación de la OMSA que se considere apropiado para uso.

Antibiograma - Rol del laboratorio de bacteriología

Las pruebas de sensibilidad antimicrobianas están estandarizadas y deben realizarse bajo procedimientos que aseguren la calidad y la confiabilidad de los resultados.

En la actualidad, las principales instituciones que tienen mayor influencia en la aplicación de los criterios de estandarización son el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de Estados Unidos y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de la Unión Europea. Sin embargo, existen otros comités y agencias, con frecuencia de carácter nacional, que contribuyen con el desarrollo paralelo de programas de estandarización de las técnicas de estudio de sensibilidad y, sobre todo, de la interpretación de los resultados obtenidos.

La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, a través del EUCAST (que representa sociedades científicas de la mayoría de los países europeos) y el CLSI, publican continuamente actualizaciones relacionadas con terminología, metodología de los estudios de sensibilidad *in vitro* y, fundamentalmente, de puntos de corte clínicos para algunos ATM, especialmente de uso en medicina veterinaria. Ambas instituciones ofrecen versiones libres y en línea de sus principales documentos.

Pruebas de sensibilidad antimicrobianas

El comportamiento bacteriano frente a los ATM se puede determinar con diferentes métodos,

- Difusión, incluye la prueba de difusión en agar con discos, antibiograma o método de Kirby Bauer. Las bacterias se categorizan según el tamaño del diámetro del halo de inhibición.
- Dilución en medio líquido o sólido. Las bacterias se categorizan según la mínima concentración del antimicrobiano que inhibió el desarrollo bacteriano (CIM).
- Gradiente de concentración o método epsilométrico, que es una combinación entre el método de difusión en agar y el método de dilución.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana de uso corriente en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario es la difusión en agar con discos, mientras que en bacterias determinadas y/o en laboratorios de investigación se utilizan las pruebas de dilución.

Condiciones para la realización de un antibiograma

Para poder realizar un antibiograma y consecuentemente definir el comportamiento bacteriano frente a los ATM que se seleccionaron es fundamental,

- Partir de un cultivo bacteriano puro, fresco e identificado.
- Seleccionar los ATM de forma prudente y responsable.
- La existencia de puntos de corte clínicos.

Selección de los ATM

La selección de los ATM adecuados para las pruebas de sensibilidad antimicrobianas y la elaboración de informes, es una decisión que cada laboratorio debe tomar en consulta con veterinarios, infectólogos, microbiólogos clínicos, farmacólogos clínicos y equipos de gestión de antimicrobianos, si están disponibles. Las recomendaciones para cada grupo de microorganismos incluyen ATM con un rendimiento aceptable en las pruebas *in vitro*. Se deben considerar la eficacia clínica, la prevalencia de resistencia, la minimización de la aparición de resistencia, el costo, las indicaciones clínicas de uso aprobadas por las agencias reguladoras y las recomendaciones de consenso actuales para los agentes de primera elección y alternativos.

Cada laboratorio de bacteriología veterinaria, en consenso con los veterinarios clínicos, deberán definir los ATM a probar teniendo en cuenta recomendaciones de referencia como los documentos *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals* (CLSI VET01S Ed. 7, 2024) o *Categorisation of antibiotics in the European Union* (EMA, 2020)

A modo de ejemplo, si se utiliza el documento VET01S (CLSI, 2024), los ATM se agrupan como A, B, C, D y E, e incluyen recomendaciones para su correcta notificación. Los ATM A, B, C y D están aprobados por las agencias o autoridades reguladoras correspondientes para el tratamiento de enfermedades en una determinada especie animal.

Grupo A: ATM con punto de corte clínico (PCC) específicos para uso veterinario y categorías interpretativas que se consideran apropiados para su inclusión en un panel de análisis primario de rutina para animales de producción y de compañía, así como para la notificación sistemática de resultados para los grupos de organismos especificados. La jerarquía recomendada para la notificación es informar primero los agentes del grupo A sobre aquellos que utilizan puntos de corte en humanos, ya que estos compuestos han demostrado una correlación aceptable entre la prueba de sensibilidad y el resultado clínico.

Grupo B: ATM con PCC específicos para uso veterinario y categorías interpretativas que se consideran apropiadas para pruebas e informes selectivos. CLSI los considera opciones secundarias, y su uso solo se considera cuando se detecta resistencia a los ATM del grupo A o cuando no existen otras alternativas razonables. Las pruebas pueden realizarse rutinariamente como parte de un programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM); sin embargo, la notificación debe realizarse con cautela y con la orientación de un programa de optimización del uso de antimicrobianos, si está disponible.

Grupo C: ATM que utilizan PCC humanos y categorías interpretativas, y son los terceros en la jerarquía de notificación. Estos agentes pueden tener un rendimiento adecuado, pero no se han demostrado resultados en muchas aplicaciones veterinarias. El laboratorio veterinario puede, a su discreción, decidir si notifica selectivamente los resultados de las pruebas de estos agentes.

Grupo D: ATM aprobados por las agencias reguladoras para su uso en una especie animal específica. Si bien se dispone de datos de control de calidad para estos ATM, no cuentan con PCC ni categorías interpretativas aprobados por el CLSI para uso veterinario o humano. Los valores de CIM de los ATM del grupo D pueden reportarse selectivamente para fines epidemiológicos, de vigilancia o de investigación, teniendo en cuenta que pueden no predecir el éxito clínico ni la probabilidad de fracaso terapéutico.

Grupo E: ATM que no están aprobados, pero que pueden usarse para una especie animal determinada según las regulaciones específicas de cada país. Estos ATM complementarios pueden analizarse e informarse selectivamente si la bacteria aislada es resistente a los grupos A, B y C. Los ATM del grupo E pueden incluirse en monitoreos de RAM o para programas de vigilancia (vancomicina, carbapenémicos).

A diferencia del CLSI, la EMA (por su sigla en inglés *European Medicine Agency*) categoriza los ATM en cuatro, considerando los siguientes criterios:

- Si la (sub)clase o grupo está autorizado para su uso como medicamento veterinario en la UE.
- La importancia de la (sub)clase o grupo para la medicina humana según la clasificación de la OMS y teniendo en cuenta la situación de la UE.

- El conocimiento de los factores que influyen en la probabilidad y las posibles consecuencias de la transferencia de RAM de animales a humanos, en particular considerando los mecanismos por los que un solo gen confiere multirresistencia (o resistencia a varias clases).
- La disponibilidad de (sub)clases de antibióticos alternativos en medicina veterinaria con menor riesgo de RAM para la salud pública y animal.

Categoría A Evitar: Los ATM no están autorizados como medicamentos veterinarios en la UE. No deben usarse en animales productores de alimentos. Pueden administrarse a animales de compañía en circunstancias excepcionales.

Categoría B Limitar: Los ATM tienen una importancia trascendental en la medicina humana y su uso en animales deberá limitarse a fin de mitigar el riesgo para la salud pública. Se considerarán únicamente cuando no haya antibióticos de las Categorías C o D que puedan ser clínicamente eficaces. Su uso se basará en pruebas de sensibilidad antimicrobiana, siempre que sea posible.

Categoría C Precaución: Para los ATM de esta categoría existen alternativas en medicina humana. Para algunas indicaciones veterinarias, no hay alternativas pertenecientes a la Categoría D. Se considerarán solo cuando no haya ATM de la Categoría D que puedan ser clínicamente eficaces.

Categoría D Prudencia: Se seleccionarán como tratamientos de primera línea, siempre que sea posible. Se usarán con precaución y solo cuando sea necesario desde el punto de vista médico.

En síntesis, el CLSI orienta principalmente a los microbiólogos encargados de realizar e informar los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas, mientras que la categorización de la EMA hace recomendaciones sobre el uso considerando el riesgo para la salud pública que supone la resistencia a los antimicrobianos debido al uso de antimicrobianos en medicina veterinaria.

Cada laboratorio debe desarrollar su protocolo para analizar ATM de rutina y complementarios para los aislamientos que se confirme su resistencia a todos los ATM en sus paneles de análisis de rutina. Debería incluir opciones para analizar ATM complementarios internamente o enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia.

En la Tabla 14.1 y Tabla 14.2 se relacionan las categorías y grupo de ATM para gatos y perros respectivamente.

Tabla 14.1*Agrupamiento de los antimicrobianos de uso en gatos*

EMA/CLSI	Grupo A	Grupo C	Grupo E
D	Ampicilina	Tetraciclina Minociclina Sulfonamidas TMS Oxacilina	
C	AMC Cefovecina	Cefazolina Gentamicina Amicacina Tobramicina Clindamicina Cloranfenicol Eritromicina	
B	Enrofloxacin Marbofloxacin Orbifloxacin		
A		Rifampicina	Imipeneme Meropeneme Vancomicina Linezolida

Nota. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico. TMS: trimetoprima/sulfametoxazol.
Gris, amarillo, naranja y rojo son los colores que identifican las categorías de ATM según la EMA.

Tabla 14.2*Agrupamiento de los antimicrobianos de uso en perros*

EMA/CLSI	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
D	Ampicilina Tetraciclina Doxiciclina Minociclina		Oxacilina Penicilina Nitrofurantoína Sulfonamidas TMS		
C	AMC Cefalexina Cefalotina Cefazolina Cefovecina Gentamicina Amicacina Clindamicina		Eritromicina		
B	Difloxacin Enrofloxacin Marbofloxacin Orbifloxacin Pradofloxacin Cefpodoxima	Ceftazidima	Colistina Azitromicina	Ceftiofur	
A			Rifampicina		Imipeneme Meropeneme Vancomicina Linezolida

Nota. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico. TMS: trimetoprima/sulfametoxazol. Gris, amarillo, naranja y rojo son los colores que identifican las categorías de ATM según la EMA.

Categorías bacterianas en función de su comportamiento frente a los antimicrobianos

Según la norma CLSI M23, luego de la realización de los antibiogramas, las bacterias pueden categorizarse como sensibles, intermedias y resistentes (y sensibles dependientes de la dosis y no sensibles, cuando corresponda). Los puntos de corte CLSI para sensible (S) o sensible dependiente de la dosis (SDD), añadidos o revisados, se basan en pautas posológicas específicas.

- **Sensible (S):** es una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM igual o inferior o un diámetro de halo de inhibición igual o superior al punto de corte de sensible, son inhibidos por las concentraciones usualmente alcanzables del ATM cuando se usa la dosis recomendada para tratar el sitio de la infección, lo que resulta en una probable eficacia clínica.
- **Sensible dosis dependiente (SDD):** es una categoría definida por un punto de corte que implica que la sensibilidad de un aislamiento depende de la pauta posológica

utilizada en el paciente. Para alcanzar niveles clínicamente eficaces contra aislamientos cuyos resultados de las pruebas de sensibilidad (CIM o difusión con discos) se encuentren en la categoría SDD, es necesario utilizar una pauta posológica (es decir, dosis más altas, dosis más frecuentes, o ambas, o infusión prolongada) que genere una mayor exposición al fármaco que la obtenida con la dosis utilizada para establecer el punto de corte de sensibilidad. Se debe considerar la pauta posológica máxima respaldada por la literatura, ya que una mayor exposición ofrece la mayor probabilidad de una cobertura adecuada de un aislado SDD. Se debe consultar la ficha técnica del fármaco para conocer las dosis recomendadas y el ajuste según la función orgánica.

- **Intermedia (I):** es una categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con CIM o diámetros de halo de inhibición dentro del rango intermedio, que se aproximan a los niveles usualmente alcanzables en sangre y tejido, o para los cuales las tasas de respuesta pueden ser menores que para los aislamientos sensibles. La decisión de reportar “I”, la toma mejor cada laboratorio basándose en las directrices específicas de la institución y en consulta con los profesionales veterinarios correspondiente. La categoría “I” también incluye una zona de amortiguamiento para la variabilidad inherente en los métodos de prueba, lo que debería evitar que pequeños factores técnicos no controlados causen discrepancias importantes en las interpretaciones, especialmente para medicamentos con márgenes estrechos de toxicidad.
- **Resistente (R):** es una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM igual o superior o un diámetro de halo de inhibición inferior al punto de corte resistente, no se ven inhibidos por las concentraciones del ATM que normalmente se pueden alcanzar con esquemas de dosificación normales y/o que demuestran CIM o diámetros de halo de inhibición que se encuentran dentro del rango en el que es probable que existan mecanismos de resistencia microbiana específicos y la eficacia clínica del ATM contra el aislamiento no se demostró de manera confiable en estudios de clínicos.
- **No-sensible (NS):** es una categoría utilizada para aislamientos en los cuales solo se designa un punto de corte sensible debido a la ausencia o rara ocurrencia de cepas resistentes. Los aislados para los cuales las CIM del ATM están por encima o los diámetros de halo de inhibición están por debajo del valor indicado para el punto de corte sensible, deben reportarse como no-sensibles. Un aislamiento que se interpreta como no-sensible, no significa necesariamente que tenga un mecanismo de resistencia.

Tabla 14.3*Puntos de corte y categorías de interpretación*

ATM	Concentración del disco	Categorías interpretativas y diámetro de inhibición Puntos de corte (mm)			Categorías interpretativas y puntos de corte de CIM (µg/ml)			
		S	I	R	S	SDD	I	R
A	5 µg	≥ 20	15 - 19	≤ 14	≤ 4		8 – 16	≥ 32
B	-	-	-	-	≤ 0,12	0,25	-	≥ 0,5
C	30 µg	≥ 18 ^{NS}	-	-	≤ 4 ^{NS}		-	-

Nota. ATM: agente antimicrobiano. S: sensible. I: intermedia. R: resistente. NS: no-sensible. El guion (–) indica que el disco no está disponible o que los puntos de corte no son aplicables. Adaptada de la tabla C. Example of Breakpoints and Interpretive Categories as Used in Tables 2, del documento CLSI M100-ED35 (2025) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, CLSI (ed. 35th). [https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI%20M100%20ED35:2025%20SECTION%20CLSI%20SUBCOMMITTEE%20ON%20ANTI-MICROBIAL%20SUSCEPTIBILITY%20TESTING%20MISSION%20STATEMENT%20\[NEXT\]](https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI%20M100%20ED35:2025%20SECTION%20CLSI%20SUBCOMMITTEE%20ON%20ANTI-MICROBIAL%20SUSCEPTIBILITY%20TESTING%20MISSION%20STATEMENT%20[NEXT])

En la tabla 14.3, los puntos de corte para el ATM A son: sensible ≥ 20 mm o ≤ 4 µg/ml y el resistente ≤ 14 mm o ≥ 32 µg/ml. El ATM B solo tiene puntos de corte disponibles para CIM, esto se debe a que los diámetros de los halos de inhibición no se correlacionan con los valores de CIM o los datos no se evaluaron según las recomendaciones del documento CLSI M23.4. Los problemas técnicos también pueden impedir el uso del método de difusión del disco para algunos agentes. Para algunos ATM, como C, solo existe la categoría de "sensible", la ausencia o la rara aparición de cepas resistentes impide definir categorías de resultados distintas de "sensible". Para las cepas que arrojan resultados sugestivos de una categoría "no-sensible", se deben confirmar la identificación del microorganismo y los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas.

Procedimiento para la realización de antibiogramas por difusión

El procedimiento de realización de antibiogramas por difusión está ampliamente descrito en diversos documentos. EUCAST, en su página web, presenta videos muy claros sobre

- Preparación del inóculo,

https://youtu.be/it8eOU_Og6k?list=PLQU_kWRWBld7qgz0AbbbUC8YU9pmC7U5g

- Siembra del inóculo en el medio de cultivo,

https://youtu.be/32clK90n4u4?list=PLQU_kWRWBld7qgz0AbbbUC8YU9pmC7U5g

- Colocación de los discos,

https://youtu.be/q_EN2Xrooy8?list=PLQU_kWRWBld7ggz0AbbbUC8YU9pmC7U5g

- Lectura de los halos de inhibición,

https://youtu.be/DZATkrj3rb4?list=PLQU_kWRWBld7ggz0AbbbUC8YU9pmC7U5g

Informe de resultados

Para elaborar el informe de laboratorio debe considerarse el método de sensibilidad antimicrobiano utilizado y para evitar interpretaciones erróneas, los informes de rutina deben incluir los ATM adecuados para uso terapéutico.

- **Método difusión con discos:** No debe informarse el diámetro del halo de inhibición sin una categoría interpretativa.
- **Método concentración inhibitoria mínima:** Los valores de CIM pueden notificarse directamente a los médicos clínicos para fines de atención al paciente. Sin embargo, para facilitar la comprensión del informe, es fundamental que también se proporcione de forma rutinaria un resultado de categoría interpretativa (S, I, R o NS).

Los laboratorios deben informar únicamente los resultados de los ATM para los cuales se definieron puntos de corte clínico, específicos de la bacteria analizada. No es adecuado aplicar la difusión con disco ni los puntos de corte de CIM utilizando documentos en los que el microorganismo no figura. En casos excepcionales, en los cuales ATM puede ser apropiado para un aislamiento, pero no existen puntos de corte del CLSI, se debe consultar el sitio web de los Criterios Interpretativos de las Pruebas de Susceptibilidad de la FDA (<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/fda-recognized-antimicrobial-susceptibility-test-interpretive-criteria>) y la ficha técnica del agente.

Informe de resultados selectivo y en cascada

Informe selectivo implica la notificación de resultados para ATM específicos según criterios definidos que no guardan relación con los resultados obtenidos mediante pruebas de sensibilidad antimicrobiana como identificación del microorganismo, localización corporal de la infección, contexto clínico o datos demográficos del paciente.

Informe en cascada implica informar los resultados de ATM específicos según el perfil general de sensibilidad de un aislamiento. Los resultados de ATM secundarios o de espectro más amplio (Nivel 2 o 3) se informan solo si el aislamiento es resistente a ATM primarios o de espectro más estrecho (Nivel 1).

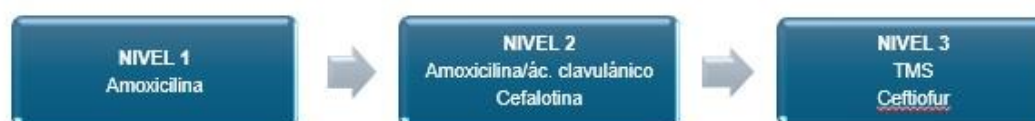
En la Figura 14.1 se esquematiza, a modo de ejemplo, una secuencia de informe de resultados en cascada correspondiente a una *Escherichia coli* aislada de orina de una perra con infección urinaria diagnosticada por primera vez. Tomando como documento de referencia las pautas para el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones bacterianas del tracto urinario

en perros y gatos elaborado por ISCAID (por su sigla en inglés *International Society for Companion Animal Infectious Diseases*).

ISCAID también publicó recomendaciones para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio de perros y gatos y foliculitis bacteriana de perros.

Figura 14.1

Ejemplo de informe de resultados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana en cascada de una Escherichia coli aislada de una perra con infección urinaria



Nota. TMS: trimetoprima/sulfametoxazol.

En la República Argentina, en el año 2022 se promulgó la Ley 27680 de prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos. En el año 2023, mediante el decreto 386/2023 se reglamentó parcialmente su implementación, quedando pendiente el capítulo VII, Salud animal y producción agroalimentaria.

Los veterinarios no pueden evadir la responsabilidad con conlleva el uso de antimicrobianos. Desde el lugar que toque ocupar, es fundamental la concientización de que su uso debe ser **PRUDENTE Y RESPONSABLE**.

Referencias

- Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal (2014). *Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis*. Infectious Diseases International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID). <https://doi.org/10.1111/vde.12118>
- Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal (2017). *Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats*. Infectious Diseases International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID).
- CLSI. (2018). *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters*. 5th ed. M23. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2020). *Procedure for optimizing disk contents (potencies) for disk diffusion testing of antimicrobial agents using harmonized CLSI and EUCAST criteria*. 1st ed. CLSI supplement M23S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2025). M100-ED35 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, CLSI (ed. 35th).
[https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI%20M100%20ED35:2025%20SECTION%20CLSI%20SUBCOMMITTEE%20ON%20ANTIMICROBIAL%20SUSCEPTIBILITY%20TESTING%20MISSION%20STATEMENT%20\[NEXT\]](https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI%20M100%20ED35:2025%20SECTION%20CLSI%20SUBCOMMITTEE%20ON%20ANTIMICROBIAL%20SUSCEPTIBILITY%20TESTING%20MISSION%20STATEMENT%20[NEXT])
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) <https://www.eucast.org/>
- European Medicines Agency. (2020). *Categorisation of antibiotics in the European Union*.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific-advice-impact-public-health-and-animal-health-use-antibiotics-animals_en.pdf
- Giacoboni, G.I., Moredo, F.A., Pantozzi, F.L. (2023). *Detección de la resistencia antimicrobiana*. EDULP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/161995>
- College of Veterinary Medicine at University of Minnesota. (2020). *Handbook of Antimicrobial Stewardship in Companion Animal Veterinary Settings*, 1st ed. Saint Paul, MN: UMN.
<https://arsi.umn.edu/handbook>.
- International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID). (2019). *Guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats* (updated 2019).
- OIE. Uso responsable y prudente de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria. (2024). En *Código Sanitario para los Animales Terrestres*.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2022). *Estrategia sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/12/es-amr-strategy-2022-final-pages-1.pdf>
- World Health Organization. (2024). *WHO List of Medically Important Antimicrobials: a risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use*.
https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gcp/who-mia-list-2024-lv.pdf?sfvrsn=3320dd3d_2

Autores

Coordinadoras

Gomez, María Fernanda

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Especialista en Docencia Universitaria. Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología FCV-UNLP. Estudiante avanzada de la Maestría en Salud Pública de la Facultad de Ciencias Médicas UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria, Bacteriología General y Microbiología Clínica Animal de la carrera Microbiología. Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionado con el estudio de la resistencia antimicrobiana en el marco de Una Salud. Áreas de experticia: bacteriología y salud pública veterinarias. E-mail: fgomez@fcv.unlp.edu.ar

Moredo, Fabiana Alicia

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Doctora en Ciencias Veterinarias. Especialista en Docencia Universitaria. Profesora Titular de la Cátedra de Microbiología FCV-UNLP. Directora del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Responsable del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria y Bacteriología General de la carrera Microbiología. Directora de estudiantes de posgrado: doctorados, maestría y especializaciones. Directora e Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de la resistencia antimicrobiana en el marco de Una Salud. Autora de trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación sobre esta temática. Áreas de experticia: bacteriología veterinaria y resistencia antimicrobiana. E-mail: fmored@fcv.unlp.edu.ar

Vinocur, Florencia

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Jefa de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria y Bacteriología General de la carrera Microbiología. Áreas de experticia: Bacteriología veterinaria y Análisis clínicos veterinarios. Directora técnica de laboratorio privado de análisis clínicos y microbiológicos. E-mail: fvinocur@fcv.unlp.edu.ar

Autores

Alvarado Pinedo, Fiorella

Doctora en Ciencias Veterinarias, Médica Veterinaria y Bacterióloga Clínica e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP).

Docente de grado en los cursos de Histología, Biología celular y del desarrollo, coordinadora de Anatomía e histología básica (Profesora Asociada de la cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP) y en los cursos de Enfermedades de los rumiantes y cerdos y de Clínica y sanidad de rumiantes (Profesora Asociada del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV-UNLP). Docente de posgrado en la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, Módulo de bacteriología y diagnóstico de enfermedades bacterianas (FCV-UNLP) y directora de becarios, tesistas, pasantías y residencias de posgrado (FCV-UNLP). Co dirección e investigadora en Proyectos relacionados con Diagnóstico y control de enfermedades en los rumiantes, Paratuberculosis y Parasitosis; y Morfología aplicada al estudio de la ontogenia, la patología y la diversidad animal. Experticia en diagnóstico microbiológico veterinario, con énfasis en micobacterias. Autora de diversos trabajos. E-mail: falvarado@fcv.unlp.edu.ar

Aurnague, Camila

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Estudiante de la carrera Doctorado en Ciencias Veterinarias. Docente-Investigadora de la Cátedra de Microbiología FCV-UNLP. Integrante del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la FCV-UNLP y del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria y Bacteriología General y Microbiología Clínica Animal de la carrera Microbiología. Participación en proyectos de investigación y desarrollo enfocados en el abordaje de la resistencia antimicrobiana desde la perspectiva Una Salud. Autora de trabajos científicos y de divulgación vinculadas a esta problemática. Áreas de especialización: bacteriología veterinaria y resistencia antimicrobiana. E-mail: caurnague@fcv.unlp.edu.ar

Gatti, Eleatrice María de las Mercedes

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Doctora en Bacteriología Clínica e Industrial. Directora del Departamento de Microbiología FCV-UNLP. Profesora Titular de la Cátedra de Microbiología Especial y Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología de la FCV-UNLP. Docente de los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria; Microbiología General, Bacteriología General y Microbiología Clínica Humana II de la carrera Microbiología. Docente de posgrado en Educación a Distancia de la Escuela de Posgrado FCV-UNLP y en Diplomatura en Ciencias Forenses de la Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales (FCJyS-UNLP). Directora e Integrante de proyectos de extensión e investigación y desarrollo relacionados con el estudio de la resistencia antimicrobiana en el marco de Una Salud. Autora de trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación. Áreas de experticia: Bacteriología humana, veterinaria y resistencia antimicrobiana. E-mail: mgatti@fcv.unlp.edu.ar

Iza, Raúl Emilio

Médico Veterinario egresado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Estudiante avanzado de la Maestría en Biotecnología de la Universidad Nacional de Quilmes (tesis en proceso). Estudiante de las especializaciones en Docencia Universitaria (UNLP) y en Bioinformática (UNLP). Docente investigador de la Cátedra de Microbiología y la Cátedra de Inmunología Animal Aplicada (FCV-UNLP). Docente de grado en los cursos Microbiología II e Inmunología Animal Aplicada de la carrera de Medicina Veterinaria y Bacteriología General de la carrera de Microbiología. Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de la resistencia antimicrobiana en el marco de Una Salud. Autor de trabajos científicos y de divulgación. Áreas de experticia: Bacteriología veterinaria y resistencia antimicrobiana. E-mail: riza@fcv.unlp.edu.ar

Lorenti, Eliana Andrea

Licenciada en Biología, orientación Zoología (Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata – FCNyM-UNLP). Doctora en Ciencias Naturales (FCNyM-UNLP). Becaria posdoctoral del CONICET. Jefa de Trabajos Prácticos del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP. Docente de los cursos Microbiología II de la carrera de Ciencias Veterinarias y Bacteriología General de la carrera de Microbiología de la FCV-UNLP. Integrante de proyectos de investigación vinculados al estudio de la parasitofauna y de bacterias resistentes a antimicrobianos en animales silvestres, en el marco del enfoque de Una Salud. Autora y co-autora de publicaciones científicas y disertante en reuniones académicas y de divulgación científica. Participante en campañas de verano antárticas. Áreas de experticia: ornitología, parasitología, ecología, bacteriología y resistencia antimicrobiana. E-mail: elorenti@fcv.unlp.edu.ar

Martín Paula Lorena

Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Doctora en Ciencias Veterinarias. Especialista en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario. Docente-Investigadora de la FCV-UNLP. Integrante del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos FCV-UNLP). Responsable del Servicio de Diagnóstico de leptospirosis de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria y Bacteriología General de la carrera Microbiología. Directora de estudiantes de posgrado: maestría y especializaciones. Directora e integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de zoonosis en animales silvestres en el marco de Una Salud. Autora de trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación sobre esta temática. Áreas de experticia: análisis clínicos y bacteriología veterinaria. E-mail: plmartin@fcv.unlp.edu.ar

Meneses, María Laura

Médica Veterinaria, Doctora en Ciencias Veterinarias, Microbióloga Clínica e Industrial egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Docente-investigadora de la FCV-UNLP. Profesora asociada de la Carrera de Bioingeniería para los cursos Biología I y II de la Universidad Nacional Arturo Jauretche. Integrante del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología II de la carrera Medicina Veterinaria, Bacteriología General, Microbiología General y Microbiología Clínica Humana II de la carrera Microbiología. Codirectora e Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de la resistencia antimicrobiana en el marco de Una Salud. Autora de trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación. Áreas de experticia: Diagnóstico bacteriológico. E-mail: mlmeneses@fcv.unlp.edu.ar

Nievas, Hernán Darío

Médico Veterinario egresado de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Estudiante de la carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias y estudiante de la Especialidad en Docencia Universitaria. Docente de grado en los cursos de Microbiología II de la carrera de Medicina Veterinaria, Bacteriología General y Microbiología Clínica Animal de la carrera de Microbiología. Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de la resistencia a antimicrobianos en el marco de Una Salud. Autor de trabajos científicos sobre la temática. Áreas de experticia: bacteriología veterinaria y resistencia antimicrobiana. E-mail: hnievas@fcv.unlp.edu.ar

Origlia, Javier Aníbal

Médico Veterinario egresado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Profesor Titular de la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos FCV-UNLP. Responsable del Servicio de Diagnóstico de Enfermedades de las Aves y Pilíferos de la FCV-UNLP. Integrante del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos de Enfermedades de las Aves y Pilíferos de la carrera Medicina Veterinaria y Prevención de Zoonosis de la carrera Microbiología. Integrante de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el estudio de enfermedades infecciosas en animales de producción y fauna silvestre en el marco de Una Salud. Autor de trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación. Áreas de experticia: patología de aves, zoonosis, bacteriología y diagnóstico molecular veterinario. E-mail: javieroriglia@fcv.unlp.edu.ar

Sosa, Pedro Sebastián

Doctor en Ciencias Veterinarias, Médico Veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Docente Investigador en el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE-FCV-UNLP). Docente de grado de los

cursos de Clínica y Sanidad de Rumiantes, Bioestadística y en Epidemiología y Salud Pública Básica (FCV-UNLP). Docente de posgrado en la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, Módulo de bacteriología y diagnóstico de enfermedades bacterianas; Curso de posgrado en técnica de necropsia, elaboración de diagnóstico morfológicos, muestreo y discusión de casos clínicos en bovinos y ovinos; dirección de pasantías y residencias de grado y posgrado (CEDIVE-FCV-UNLP). Experticia en diagnóstico veterinario patológico y microbiológico, con énfasis en micobacterias. Autor de diversos trabajos científicos sobre estas temáticas. E-mail: pssosa@fcv.unlp.edu.ar

Travería Gabriel Eduardo

Doctor en Ciencias Veterinarias, Médico Veterinario, Bacteriólogo Clínico e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Profesor titular en el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), Profesor Adjunto de la Cátedra de Inmunología Veterinaria, docente de los cursos de grado de Inmunobiología animal aplicada, Clínica y sanidad de rumiantes y Enfermedades de los rumiantes y cerdos. Docente de posgrado en el Módulo de bacteriología y diagnóstico de enfermedades bacterianas de la Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario (FCV-UNLP). Dirección de tesis, becarios, pasantes y residentes en el CEDIVE. FCV-UNLP. Investigador en Proyectos de Investigación y Desarrollo. Experticia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas de los rumiantes, equinos y porcinos, con énfasis en el diagnóstico microbiológico y en el diagnóstico y control de micobacterias. Autor de artículos en revistas científicas y presentaciones en congresos. E-mail: traveria@fcv.unlp.edu.ar

Alvarado Pinedo, Fiorella

Bacteriología en medicina veterinaria : guía para el diagnóstico de infecciones bacterianas en pequeños animales / Fiorella Alvarado Pinedo ; María Fernanda Gómez ; Coordinación general de María Fernanda Gómez ; Fabiana Alicia Moredo ; Florencia Vinocur ; Fotografías de Eliana Andrea Lorenti. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2026.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-2730-9

1. Bacteriología. 2. Perros. 3. Gatos. I. Gómez, María Fernanda, coord. II. Moredo, Fabiana Alicia, coord. III. Vinocur, Florencia, coord. IV. Lorenti, Eliana Andrea, fot. V. Título.
CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina

+54 221 644 7150

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

EduLP integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2026

ISBN 978-950-34-2730-9

© 2026 - EduLP

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA