

Libros de **Cátedra**

Introducción a la microbiología clínica

Horacio A. Lopardo (coordinador)

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas

 **Edulp**
Editorial
de la Universidad
de La Plata



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Horacio A. Lopardo
(coordinador)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



A la memoria de Chilo Zaragoza, bárbaramente asesinado por aspirar a un mejor plan de estudios de la carrera de Bioquímica y a través de ella, a todos los estudiantes comprometidos en la lucha por una Universidad mejor y más inclusiva.

Epígrafe

Lopardo HA, Gobet LM, Viegas Caetano JA, Moviglia AM, Vigliarolo LO, Suárez MC. Introducción a la Microbiología Clínica.

El objetivo de este texto es tratar de ofrecer al estudiante de Microbiología Clínica un material que le permita adquirir los conocimientos teóricos y prácticos básicos de un curso de pregrado en esta materia.

La Microbiología Clínica es la disciplina que se ocupa del diagnóstico y seguimiento microbiológico de las enfermedades infecciosas como así también de los estudios epidemiológicos relativos a las mismas.

Esta materia comprende el estudio microbiológico de las infecciones virales, parasitarias, fúngicas y bacterianas. El enfoque inicial de una muestra debe apuntar a considerar la posibilidad de alguno de estos agentes. A veces el cuadro clínico es orientador y el estudio se focaliza a alguno o algunos de estos microorganismos. Dado que en esta Facultad se tratan separadamente la Virología, la Parasitología y la Micología, en este texto nos enfocaremos especialmente al estudio bacteriológico aunque mencionaremos, cuando corresponda, el tratamiento inicial de muestras (toma, conservación y transporte) destinadas al estudio de otros agentes.

La Bacteriología Clínica se ocupa de todo lo relacionado a los procesos infecciosos debidos a agentes bacterianos. Estudia las características fisiológicas, anatómicas, los métodos de identificación de las bacterias y su relación con el hospedador y con las drogas antimicrobianas utilizadas en la desinfección, antisepsia o quimioterapia. También describe los métodos utilizados para el procesamiento de los materiales clínicos, las normas de bioseguridad requeridas y los controles de calidad necesarios para un buen desempeño en un laboratorio especializado en este tema.

Es importante conocer el ciclo que recorre una muestra clínica desde la toma inicial hasta llegar a un diagnóstico microbiológico.

En primer lugar, el médico evalúa al paciente y dentro de su planteo diagnóstico decide el envío de una muestra al Laboratorio de Microbiología. Quien realice la toma de muestra (médico, enfermero, extraccionista, etc.) debiera conocer las normas de toma y conservación de muestras destinadas al estudio microbiológico. Estas normas deben ser elaboradas por el laboratorio de Microbiología, al igual que las instrucciones que se le dan al paciente en los casos en que corresponda (p. ej. en una toma de urocultivo de un paciente ambulatorio).

La muestra se envía con una solicitud de estudio, confeccionada por el laboratorio y en ella deberán indicarse los datos del paciente (sexo, edad, síntomas, enfermedad de base, si recibió o no

antibióticos, etc.) y datos correspondientes a la muestra (modo de conservación, lugar y forma de la toma de muestra, etc.).

De este modo, el microbiólogo contribuye al diagnóstico de la enfermedad infecciosa desde el ángulo de observación correspondiente a la bacteria, es decir, identificación del presunto agente etiológico y determinación de su sensibilidad in vitro a los antimicrobianos. Todo esto deberá ser valorado por el microbiólogo con los elementos que él dispone y discutido con el médico de cabecera que es quien conoce la historia clínica del paciente.

Con las pruebas de sensibilidad y los cultivos de control también contribuye al seguimiento del paciente en el curso del tratamiento.

Lamentablemente, también se puede llegar a establecer la causa de una muerte por infección de etiología bacteriana. Esto, no obstante, contribuye a adquirir conocimientos que quizás permitan, en el futuro, abordar con éxito casos similares o incluso a prevenirlos.

La labor del microbiólogo no se circunscribe a un paciente en particular sino que es vital su participación en la detección de brotes epidémicos o hiperendémicos, en el conocimiento de la prevalencia de tal o cual microorganismo en un determinado contexto y en las tendencias que ocurren respecto a la sensibilidad a los antimicrobianos dentro y fuera del hospital.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata por disponer de este medio para facilitar la formación de nuevos profesionales.

A la Facultad de Ciencias Exactas por habernos permitido formarnos en nuestra disciplina y por recibirnos posteriormente como docentes.

A Mónica Bertin y Ana Manasanch de EDULP, quienes nos guiaron en este proceso editorial.

A Pedro Pellegrino, técnico del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Prof Dr Juan P. Garrahan” por aportarnos desinteresadamente algunas sus fotos.

Al Bioq. Carlos D. Roldán, microbiólogo del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Prof Dr Juan P. Garrahan” por su aporte en el tema “Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales”.

A nuestros maestros, colegas, compañeros de trabajo y alumnos por contribuir a nuestra formación, de uno u otro modo.

Índice

PARTE I

GENERALIDADES

Capítulo 1

Medios de cultivo, aislamiento e identificación de las bacterias _____ 12

Capítulo 2

Seguridad en el laboratorio _____ 22

Capítulo 3

El microscopio _____ 27

PARTE II

ETAPA PREANALÍTICA

Capítulo 1

Instrucciones al paciente, toma, conservación y procesamiento inicial de las muestras destinadas al estudio microbiológico _____ 33

PARTE III

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PATOLOGÍA EN EL HOMBRE

Capítulo 1

Cocos gram positivos _____ 39

Capítulo 2

Bacilos gram negativos _____ 69

Capítulo 3	
Cocos gram negativos _____	104

Capítulo 4	
Bacilos gram positivos aerobios y facultativos _____	107

Capítulo 5	
Micobacterias _____	119

Capítulo 6	
Micoplasmas, clamidias y rickettsias _____	122

Capítulo 7	
Anaerobios _____	131

Capítulo 8	
Espiroquetas _____	139

PARTE IV
PROCESAMIENTO DE MATERIALES CLÍNICOS HUMANOS

Capítulo 1	
Infecciones respiratorias altas _____	144

Capítulo 2	
Infecciones respiratorias bajas _____	157

Capítulo 3	
Investigación del bacilo de Koch _____	164

Capítulo 4	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones urinarias _____	171

Capítulo 5	
Hemocultivos _____	181

Capítulo 6	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres _____	188

Capítulo 7	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos _____	202
Capítulo 8	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares _____	209
Capítulo 9	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central _____	218
Capítulo 10	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales _____	230
Capítulo 11	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares _____	246
Capítulo 12	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto genital _____	252
Capítulo 13	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones intraabdominales _____	264
PARTE V	
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	
Capítulo 1	
Introducción _____	271
Capítulo 2	
Pruebas de sensibilidad por dilución en medio líquido _____	274
Capítulo 3	
Pruebas de sensibilidad por dilución en medio sólido _____	281
Capítulo 4	
Poder bactericida del suero _____	284

Capítulo 5

Pruebas de sensibilidad por difusión _____ 286

Capítulo 6

Curvas de muerte _____ 291

BIBLIOGRAFÍA GENERAL _____ 297

APÉNDICE I. Coloraciones _____ 298

APÉNDICE II. Medios de cultivo _____ 304

APÉNDICE III. Pruebas bioquímicas _____ 331

LOS AUTORES _____ 357

PARTE I

Generalidades

CAPÍTULO 1

Medios de cultivo, aislamiento e identificación de bacterias

Introducción

El cultivo de un microorganismo se basa en el conocimiento de sus necesidades nutritivas y físicas. En el laboratorio podemos preparar o seleccionar medios adecuados a las necesidades de crecimiento de una bacteria. Un medio puede ser de consistencia líquida, en este caso se denomina caldo, o sólida, si se agrega agar al caldo. El agar es un polisacárido, extraído de algas, que funciona como sustancia solidificante e inerte, ya que no actúa como elemento nutritivo frente a la gran mayoría de las bacterias. Se comercializa en forma de polvo o gránulos finos y se puede agregar a cualquier caldo en concentración de aproximadamente 15 a 20 gramos por litro, de acuerdo a la calidad y grado de hidratación. El agar le confiere al medio una consistencia sólida, o si se agrega en menor cantidad se pueden preparar medios semisólidos. Muchos de los adelantos de la Microbiología se debieron al uso del agar, que ha permitido aislar y diferenciar bacterias, proceso que no es posible en medios líquidos.

Clasificación de acuerdo a la composición

Sintéticos o definidos

Se conoce su composición química exacta. Puede ser una simple solución de sales con una fuente de carbono o puede contener varios componentes orgánicos.

No sintéticos o complejos

Se desconoce el contenido químico exacto. Por lo general, entran en su composición extractos de tejidos o infusiones. Un ejemplo es un caldo nutritivo que contiene:

1. Peptona, que es una proteína parcialmente digerida y que sirve como fuente de nitrógeno, de carbono y de energía.
2. Extracto de carne vacuna, mezcla de vitaminas y minerales.
3. Cloruro de sodio, sal que no es absolutamente esencial, pero que regula las propiedades osmóticas del medio.

En la actualidad se dispone de medios comerciales o sus componentes deshidratados, en forma de polvo o gránulos. La preparación y la función por lo general figuran en el envase, como también la forma de conservación. Existen manuales de laboratorio donde se pueden consultar todos los detalles de las técnicas de preparación, finalidad de los medios y forma en que desarrollan determinados grupos de bacterias. La preparación de algunos medios utilizados en Microbiología Clínica puede consultarse en el Apéndice II.

A veces es necesario agregar o eliminar componentes en un medio básico con el objeto de cultivar, enriquecer, diferenciar y/o aislar selectivamente determinado tipo de bacterias. Por tal motivo existe una clasificación basada en la función que cumple cada medio de cultivo.

Clasificación de acuerdo a la finalidad

Medios no selectivos

Tienen por finalidad obtener el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos. Son ejemplos el agar tripteína de soja adicionada de 5 % de sangre de oveja y el agar chocolate.

No existen medios universales. Las bacterias varían enormemente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, por lo que ningún medio es capaz de promover el crecimiento de todas las bacterias que existen en la naturaleza.

Medios enriquecidos

Contienen un medio basal de apoyo al crecimiento, al cual se le agregan suplementos, como vitaminas, hemina, suero bovino, etc. y están dirigidos a recuperar bacterias exigentes en requerimientos nutritivos. Por ejemplo, un medio para cultivar gérmenes anaerobios consiste agar tripteína de soja (medio basal) con agregado de hemina, vitamina K y sangre lisada de caballo (suplementos nutritivos).

Medios selectivos

Tienen como objeto seleccionar determinado tipo de bacterias y eliminar otras acompañantes en materiales clínicos donde se encuentran mezcladas. Se logra generalmente agregando a un medio

básico colorantes como el cristal violeta o antibióticos para inhibir el desarrollo de algunos grupos de microorganismos en forma selectiva. Hay otras formas de convertir un medio de cultivo en medio selectivo, como por ejemplo, realizar ajustes en el pH, utilizar algún componente específico como única fuente de carbono y energía, acrecentar las propiedades osmóticas con una mayor concentración de cloruro de sodio, entre otras.

El criterio que se aplica es el de agregar o quitar elementos a un medio básico proporcionando un medio de cultivo favorable a las bacterias que se quieren seleccionar y desfavorable para las acompañantes.

Existe una gran cantidad de estos medios que se usan en forma corriente en el laboratorio clínico, como Agar Chapman (Agar Manitol Salado) para seleccionar *Staphylococcus*, agar SS para seleccionar *Salmonella* y *Shigella*, medio de Skirrow (con antibióticos) para *Campylobacter*, entre otros.

Medios diferenciales

Permiten distinguir la presencia de distintos microorganismos en el cultivo y dan una orientación rápida sobre algunos géneros y especies. Un ejemplo es el medio de Levine o agar EMB, que contiene entre sus componentes, lactosa como fuente de carbono y dos colorantes, eosina y azul de metileno. Las bacterias que no atacan la lactosa dan colonias transparentes y las que producen acidez a partir de la lactosa dan colonias rojas, rosadas u oscuras. La especie *Escherichia coli* produce colonias oscuras y de brillo metálico a diferencia de otras enterobacterias como *Enterobacter* spp. o *Klebsiella* spp., cuyas colonias son rosadas. Este medio además de diferencial, es semiselectivo, ya que los colorantes no permiten el crecimiento de las bacterias gram positivas o hacen que su desarrollo se vea inhibido.

Medios de enriquecimiento

Son caldos selectivos que contienen un agente que inhibe la microbiota acompañante y favorece el crecimiento del agente infeccioso. En ciertas muestras (por ejemplo, materia fecal) el agente infeccioso, por ejemplo *Salmonella* sp., puede ser superado en número por agentes bacterianos de la microbiota normal que tengan una mayor velocidad de crecimiento. El caldo selenito inhibe durante un tiempo el crecimiento de *E. coli* y otras enterobacterias, pero no el de *Salmonella* y el agua peptonada alcalina permite el desarrollo de *Vibrio cholerae*, pero dificulta el crecimiento de otras bacterias.

Medios cromogénicos

Básicamente son medios de cultivo que incluyen en su composición compuestos cromógenos incoloros o débilmente coloreados que son sustratos de enzimas específicas. Cuando estas enzimas

degradan el sustrato cromogénico, éste se transforma en una molécula coloreada. Estos medios de cultivo, permiten así la identificación presuntiva de algunos patógenos frecuentes en un solo paso. Su ventaja más importante, sin embargo, se vincula a la puesta en evidencia de las muestras polimicrobianas, por su mejor capacidad de discriminación de colonias diferentes.

La recuperación de microorganismos no es muy distinta de la que puede obtenerse con otros medios como el CLDE.

Algunos de estos medios cromogénicos fueron diseñados para la recuperación de patógenos específicos: estreptococos del grupo B, estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, etc.

Medios y sistemas de identificación

Se utilizan para conocer a qué familia, género, especie o grupo pertenece una bacteria, como también para diferenciar bacterias muy relacionadas. En el laboratorio de Bacteriología Clínica se recurre normalmente a métodos destinados a poner de manifiesto alguna propiedad bioquímica específica. Entre ellas, podemos citar la determinación de la capacidad de la bacteria en estudio de producir ciertas enzimas (coagulasa, fosfatasa alcalina, catalasa, oxidasa), de hidrolizar algún compuesto (esculina, urea), de producir acidez a partir de hidratos de carbono (apéndice 3). Si bien existen reacciones bioquímicas que son bastante definitorias, en general la información que proveen se debe tomar en el contexto de la bacteria en estudio. Se debe hacer una selección del mínimo número de reacciones bioquímicas a estudiar para lograr una definición, teniendo en cuenta que no es recomendable basarse en una única prueba para distinguir entre dos especies.

Dentro de los medios de identificación existen algunos que se utilizan como multiprueba. Por ejemplo, el medio TSI (Triple Azúcar Hierro) en el cual después de cultivar entre 18 y 24 horas un bacilo gram negativo, se pueden hacer simultáneamente varias lecturas, como producción de ácido sulfhídrico, fermentación de glucosa, acidez a partir de lactosa y/sacarosa y producción de gas. Con esta lectura y alguna otra reacción, como la producción de oxidasa, se tiene en muchos casos una buena orientación inicial sobre la posible identidad de la bacteria.

Hay sistemas miniaturizados manuales (p.ej api) y automatizados (p.ej Vitek, Micro Scan o Phoenix) que a través de una combinación de pruebas, proveen un bionúmero que confrontado en una base de datos nos da la identificación más probable.

También hay en el mercado discos y tabletas con sustratos que con la utilización de un inóculo bacteriano denso pueden detectar reacciones enzimáticas sin que exista desarrollo de la bacteria.

Recientemente, se ha aplicado la espectrometría de masas a la identificación de patógenos bacterianos. El método, llamado MALDI-TOF MS se basa en la diferente velocidad que adquieren partículas cargadas en una cámara de ionización. MALDI-TOF MS son las iniciales de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry. Brevemente, el aparato consiste en: (a) una cámara de ionización, dentro de la cual ocurre la vaporización de la muestra a través de rayos láser;

(b) un analizador del tiempo de vuelo, que depende de la masa de cada partícula; y (c) un detector de partículas. En la preparación, la muestra se gotea junto a una matriz química en una placa. La matriz es una sustancia de fácil sublimación y de fuerte absorbanza a la longitud de onda empleada. La placa con la muestra y la matriz se colocan dentro de la cámara de ionización. Allí la irradiación con láser produce la excitación vibracional de la matriz y ocurre la eyección de las moléculas de la muestra junto con moléculas de la matriz, agua e iones. Las moléculas de la muestra se cargan positivamente por transmisión de protones por parte de las moléculas de la matriz. Los cationes formados son acelerados en un campo eléctrico en la cámara de ionización a una velocidad que depende de la relación masa/carga. Luego, las partículas dejan la cámara y entran en el analizador de masas. Aquí viajan de forma libre y el tiempo de tránsito se mide al arribar cada partícula al detector. En base a ese tiempo se construye un espectro de masas que se compara con los incluidos en la base de datos. De esta manera se obtiene la identificación de la bacteria por comparación de espectros producidos por bacterias de diferentes especies, que se encuentran almacenados en una base de datos.

Medios de transporte

Cuando se deben investigar microorganismos que pierden fácilmente viabilidad fuera de su hábitat y por alguna circunstancia no se los puede cultivar inmediatamente, se recurre a los medios de transporte, que se caracterizan por no poseer nutrientes pero sí condiciones de humedad, isotonicidad, pH y presencia de algunos reductores como cisteína o tioglicolato de sodio. Son ejemplos el medio de Stuart, el medio de Cary y Blair y el de Amies, que contiene carbón activado.

Preparación de los medios de cultivo

En la preparación de un medio de cultivo, ya se realice a partir de materias primas o de medios comerciales deshidratados, hay que tener en cuenta algunos parámetros como la consistencia, el pH, el color, la transparencia (ausencia de precipitados, homogeneidad), temperatura adecuada en la disolución, esterilización y agregado de componentes como sangre, vitaminas o antibióticos.

En el laboratorio clínico se utiliza básicamente el método de esterilización por calor húmedo, pero con frecuencia se debe recurrir a métodos como la filtración para obtener soluciones estériles de antibióticos, vitaminas u otros componentes que no toleran el calor. Éstas se agregarán al medio básico una vez esterilizado y frío, si es líquido, o a la temperatura de 45 a 50°C si es sólido. Para obtener agar sangre se le agrega sangre en proporción del 5% a un medio sólido fundido (agar tripteína de soja o agar Columbia) a 45-50°C. Para obtener agar chocolate la sangre se agrega cuando el medio está fundido a 80-82°C y se mantiene a esa temperatura durante unos minutos, para provocar la descomposición de los glóbulos rojos que liberan el factor V sin dañarlo y a su vez inactivan enzimas destructoras de dicho factor. La temperatura no debe exceder esos valores porque el calor podría inactivar el NAD (factor V).

En la utilización correcta de los medios de cultivo también hay que recordar las condiciones de incubación: la tensión de oxígeno y de CO₂, la temperatura y el tiempo de incubación.

Control de calidad de los medios de cultivo

En general, se utilizan medios deshidratados, que se reconstituyen en el laboratorio, o medios ya preparados, listos para usar. En todos los casos deben ser conservados y procesados de acuerdo a las especificaciones del fabricante, teniendo siempre en cuenta la fecha de vencimiento y las condiciones de conservación y observando antes de usarlo las características físicas del mismo. Si se trata de medios en polvo verificar su hidratación, consistencia y/o color.

Control de esterilidad

Al menos un 5% de las unidades de medios distribuidos en placas de Petri debe ser incubado a 35°C durante 24 horas. A los medios que contienen sangre conviene incubarlos 24 horas más a temperatura ambiente, para controlar el desarrollo de bacterias psicrófilas como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas putida*.

Cuando se detecte más de un 10% de placas contaminadas, debe desecharse todo el lote.

Apariencia y color

Se debe observar que las características del medio preparado respondan a su composición. La presencia de algún precipitado, a menos que el medio contenga algún componente insoluble, indica algún problema en la técnica de preparación, en la calidad del agua utilizada o en la calidad del medio comercial. Si el precipitado desaparece cuando el medio se coloca a la temperatura de incubación, se considera que es satisfactorio. Si el color no es el esperado, se debe controlar el pH, cuyo valor debe caer dentro de $\pm 0,2$ unidades de lo especificado en la fórmula. Este control se realiza para cada lote de placas compradas o cada vez que se prepara el medio.

Control de pH

Deberá controlarse que el medio preparado tenga el mismo pH que se especifica en la literatura o en las recomendaciones del fabricante. Se debe rehidratar con agua de pH controlado y efectuarse una medida inicial previa a la esterilización.

La medición final se realiza a una de las placas preparadas después su esterilización y solidificación.

1. Calibrar el pHmetro utilizando los estándares comerciales de pH 4, 7 y 10.
2. Enjuagar el electrodo con agua destilada y secar con papel absorbente.
3. Apoyar suavemente sobre la superficie del agar, el electrodo de superficie y efectuar la lectura de pH.
4. Enjuagar el electrodo con agua destilada, y secar nuevamente con papel absorbente.
5. Dejar sumergido el electrodo en una solución de KCl 3,8M.

Este ensayo debe realizarse cada vez que se prepara un lote de medio o cada vez que se adquiera un lote comercial de placas preparadas. Se debe controlar una placa por cada lote¹.

Control de crecimiento

El control se realiza en una de las placas preparadas y se utilizan cepas bacterianas de especies que sean exigentes para el desarrollo o que muestren características particulares en el medio. Por ejemplo, para evaluar la capacidad de crecimiento de cepas del género *Haemophilus* en el medio HTM, se debe hisopar una suspensión con turbiedad equivalente a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland de la cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 (cepa con alto requerimiento de factor X) en una placa de agar HTM. Incubar 18h a 35°C en atmósfera con 5% de CO₂. El lote se considera apto para su empleo cuando se obtiene un desarrollo confluyente de esa cepa.

Criterios de aceptación

Un lote de medio de cultivo será aceptado si todos los controles de calidad se encuentran dentro de los valores establecidos. Si alguno de los controles diera fuera de los valores permitidos, aún luego de realizar acciones correctivas para subsanarlo, se debe descartar ese lote de medio.

Estabilidad y condiciones de conservación

Las placas preparadas deben ser almacenadas entre 2 y 8° C en bolsas selladas.

Los frascos con medios que no vayan a ser utilizados en el momento deberán guardarse en un lugar seco al resguardo de la luz solar.

Antes de su utilización se debe controlar que los medios de cultivo no presenten evidencia de descoloración, deshidratación, rotura del agar, volumen insuficiente, evidencias macroscópicas de

¹ En caso de ser necesario, corregir el pH de un lote de medio. Se aconseja utilizar soluciones de NaOH 1N o HCl 1N (de esta forma se utilizarán mínimas cantidades que no alterarán el volumen final del medio). En general, se considera que aproximadamente 0,5 ml de HCl 1N disminuye el pH de un litro de agar en 0,1 unidades de pH.

crecimiento bacteriano o micótico u otros signos de deterioro. Se sugiere descartar los medios que presenten algunas de estas características.

Registros

Anotar en la planilla de registro de preparación de medios, la fecha de preparación, el número de lote y la cantidad de medio preparado. Dejar asentado en la misma planilla los resultados de los controles de calidad realizados a cada lote, así como también las acciones correctivas, en caso de haber sido necesarias.

Deshidratación

No utilizar medios sólidos que presenten la superficie resquebrajada o separada del borde de la placa. Para evitar este problema, las placas preparadas y controladas se envasan en bolsas de plástico y se conservan en heladera. Deben llevarse a temperatura ambiente antes de ser utilizadas.

Prueba de rendimiento del medio

Antes del uso de cada nuevo lote deben realizarse controles con cultivos de referencia. Los medios de cultivos primarios deben ser sembrados con los microorganismos más exigentes, dentro de la gama de gérmenes para los que están destinados.

Los medios selectivos deben probarse tanto con los microorganismos capaces de desarrollar en los mismos como con los que deben inhibir.

Los medios de identificación deben probarse tanto con microorganismos que den las pruebas positivas como con aquellos que las den negativas.

En la tabla 1, a manera de ejemplo, se indican qué microorganismos se pueden utilizar para realizar el control de calidad de algunos medios.

Controles de la composición del Agar Mueller Hinton

Espesor del agar

La medición se realiza sólo al Agar Mueller Hinton.

El ensayo puede realizarse de diferentes formas:

- 1- Introducir el segmento posterior del calibre en el agar. Se aconseja no presionar en exceso el cuerpo del calibre sobre la superficie del agar dado que esta puede aplastarse y dar valores de espesor inferiores a los reales.
- 2- Introducir dentro del agar un elemento fino estéril marcado a 3,5 - 4,5 mm en uno de sus extremos y medir que la altura del agar en la placa esté dentro de este rango.
- 3- Cortar con lanceta o bisturí una porción del agar contenido en la placa de Petri, y medir su espesor utilizando calibre.

La medición del espesor del agar se deberá realizar en distintos sectores de la placa para asegurar que sea uniforme.

Tabla 1. Condiciones para la realización del control de calidad de algunos medios de cultivo

Medio	Atmósfera y tiempo de incubación	Microorganismo de control	Resultados esperados
Agar sangre	Aerobiosis 24 h.	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Desarrollo con hemólisis beta Desarrollo con hemólisis alfa
Agar chocolate	10% CO ₂ 24 h.	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Desarrollo Desarrollo
CLDE	Aerobiosis 24 h.	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis.</i>	Colonias amarillas Colonias discretas de color verde
Agar SS (<i>Salmonella</i> – <i>Shigella</i>)	Aerobiosis 24 h.	<i>Salmonella</i> spp. <i>Escherichia coli</i>	Colonias transparentes con punto negro central. Sin desarrollo o inhibido, color rojo mate.
Agar citrato de Simmons	Aerobiosis 24 h.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Desarrollo y color azul Sin desarrollo
Fenilalanina desaminasa	Aerobiosis 24 h.	<i>P. mirabilis</i> <i>E. coli</i>	Positivo Negativo

Frecuencia del ensayo: cada vez que se prepara un lote de agar Mueller Hinton o cada vez que se adquiera un lote comercial de placas preparadas se deben controlar dos a cinco placas por lote.

El lote se considera apto para su empleo cuando la profundidad del agar en la placa de Petri se encuentra dentro del rango de 3,5 – 4,5 mm.

Control de timina o timidina

Para evaluar el contenido de timidina del Agar Mueller Hinton se debe enfrentar a la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con un disco de trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) en una de las placas preparadas.

El lote se considera apto para su empleo cuando se obtiene un halo de inhibición claro y definido de 20 mm de diámetro o más. De lo contrario, el medio no podrá utilizarse para evaluar la sensibilidad a trimetoprima/sulfametoxazol.

Frecuencia del ensayo: Se debe controlar una placa por cada lote, cada vez que se prepara un lote de agar Mueller Hinton o cada vez que se adquiera un lote comercial de placas preparadas.

Control de la concentración de cationes bivalentes

Para controlar el contenido de cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} del agar Mueller Hinton, se deberá realizar el ensayo de antibiograma por difusión, enfrentando la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a un disco de gentamicina (10µg). Para controlar el contenido de Zn^{2+} se deberá enfrentar dicha cepa a un disco de imipenem (10 µg).

El lote se considera apto para su empleo cuando se obtiene un halo de inhibición de 19 a 25 mm para gentamicina (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y de 20 a 28 mm para imipenem (Zn^{2+}) con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

El agar Mueller Hinton con exceso o defecto de cationes no es apto para la realización de pruebas de sensibilidad por difusión.

Frecuencia del ensayo: Cada vez que se prepara un lote de agar Mueller Hinton, o cada vez que se adquiera un lote comercial de placas preparadas. Se debe controlar una placa por cada lote.

Descontaminación de cultivos a descartar

Cuando los cultivos se dan por finalizados y se quieren desechar, es necesario antes proceder a su descontaminación. Lo más conveniente es someterlos a esterilización por calor húmedo, 125°C, 30 minutos, en los envases que se han utilizado para el cultivo. Sólo así se pueden desechar los medios y el material descartable (descartados en bolsas de un determinado color, por ejemplo rojo) y recuperar los envases reciclables, por ejemplo tubos de vidrio (descartados en bolsas de otro color y de un espesor de 150 micrones).

CAPÍTULO 2

Seguridad en el laboratorio

Objetivos de la seguridad

- a) Evitar accidentes laborales
 - Manipulando adecuadamente los materiales biológicos.
 - Manejando con seguridad los residuos del laboratorio.
 - Evitando accidentes por electricidad.
 - Evitando incendios y, en caso de incendio, aplicando normas de seguridad.
 - Manipulando, almacenando y eliminando en forma segura productos químicos y sustancias radiactivas.
- b) Mejorar el nivel de competencia del personal según un programa de capacitación.

Incendios

Deben existir matafuegos ABC. Hay extinguidores A que controlan incendios producidos por residuos, madera y/o papel; extinguidores B, que controlan incendios cuando involucran productos químicos; extinguidores C, que controlan aquéllos generados por problemas eléctricos; y combinaciones de los mismos. Dado que en un laboratorio de Microbiología los riesgos de incendio son variados, se requieren extinguidores ABC.

Deberán existir gráficos de evacuación y señalización de salidas de emergencia.

Se participará de simulacros generales cuando las autoridades pertinentes lo soliciten.

Problemas eléctricos

Para prevenir problemas eléctricos deberá controlarse todo el cableado del laboratorio y reemplazar cables en mal estado o que no correspondan a lo requerido, por los aparatos a enchufar. Se debe evitar el uso de alargadores y controlar las conexiones a tierra.

Almacenamiento de compuestos químicos

Es necesario confeccionar planillas con los compuestos almacenados, clasificados según su grupo de riesgo (cancerígenos, mutágenos, teratógenos, corrosivos, venenosos, inflamables, oxidantes).

Se deben establecer precauciones de almacenamiento (por ejemplo, colocar las botellas de ácidos concentrados en los estantes inferiores, para evitar que, en caso de accidente, se vuelquen sobre el operador). También se deben explicitar los procedimientos a aplicar en casos de derrames y establecer reglas de manipulación (por ejemplo, uso de protección frente a determinados compuestos).

Bioseguridad

Como premisas fundamentales de la bioseguridad se debe:

(1) Considerar a todas las muestras que ingresen al laboratorio como de alto riesgo de contaminación para el operador.

(2) Informar por escrito al profesional a cargo del laboratorio de todo accidente o exposición que ocurra para luego efectuar una posterior notificación a las autoridades pertinentes. Los cuidados médicos deberán efectuarse inmediatamente.

(3) Informar al personal del laboratorio de las reglas para trabajar con agentes patógenos y los riesgos que implica el no cumplimiento de las mismas.

(4) Ofrecer inmunización apropiada cuando esté disponible.

Prácticas microbiológicas estándar

1. El acceso a los laboratorios deberá restringirse de acuerdo a los trabajos que en ellos se estén realizando. De todos modos, éste estará limitado al personal del laboratorio en áreas de trabajo. No está permitido el ingreso de niños ni de mujeres embarazadas ajenas al laboratorio, ni de individuos inmunocomprometidos.
2. Deberán utilizarse guantes para manipular materiales que contengan microorganismos viables o sustancias tóxicas o corrosivas. No reutilizar los guantes una vez que se hayan quitado.
3. Se deberán proveer de ropas protectoras de laboratorio (camisolines, barbijos, guantes, antiparras, entre otras), las que se recambiarán de acuerdo a lo estipulado en cada caso. Los camisolines y/o guardapolvos que se han utilizado en el manejo de materiales clínicos humanos o microorganismos aislados, no se podrán retirar del área de trabajo. Cuando estén sucios, deberán ser enviados en condiciones adecuadas a quien realice la tarea del lavado de estas prendas.

4. No utilizar zapatos abiertos
5. Luego de manipular materiales contaminados, las personas deberán quitarse los guantes e inmediatamente deberán lavarse las manos. Lo mismo deberán hacer antes de retirarse del laboratorio.
6. No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
7. No morderse las uñas ni masticar lapiceras.
8. Está prohibido pipetear con la boca. Se utilizarán dispositivos mecánicos.
9. Los objetos cortantes (por ejemplo, cubreobjetos o portaobjetos) o punzantes (por ejemplo, agujas) deberán descartarse en los recipientes instalados en cada mesada de trabajo para tal fin. Cuando el recipiente esté ocupado en las 3/4 partes de su volumen, deberá ser retirado para ser descontaminado.
10. Todos los procedimientos se deberán efectuar minimizando la creación de aerosoles o salpicaduras.
11. Las mesadas en las que se pipeteen soluciones o suspensiones deberán contar con propipetas o micropipetas adecuadas.
12. Todas las mesadas deberán tener alcohol de 70° (renovación semanal), y solución de hipoclorito de sodio al 1% (renovación diaria) para descontaminar las áreas de trabajo.
13. En todos los sectores deberá haber bolsas de determinado color (por ejemplo negras) para el descarte de residuos comunes, recipientes con la etiqueta de riesgo biológico y bolsas de otro color (por ejemplo, rojas) para descontaminar y descartar material contaminado y bolsas de otro color (por ejemplo, transparentes) de 150 micrones de espesor para descontaminar y reciclar.
14. Las superficies de trabajo se deberán descontaminar al menos una vez al día o luego de algún derrame visible.
15. Todo material a reusar o descartar, debe ser previamente descontaminado. No efectuar la limpieza del mismo en el laboratorio.
16. Todos los cultivos, *stocks* o materiales clínicos a desecharse deberán ser descontaminados previamente. Para ello deberán colocarse en bolsas de mayor espesor (transparentes), si se trata de recipientes reciclables, o bolsas rojas, si se trata de elementos descartables. Las bolsas se transportarán a los descontaminadores (autoclaves) y se procesarán de acuerdo a los procedimientos adecuados (125°C durante media hora) o se entregarán al personal encargado de los residuos patológicos.
17. Todos los procedimientos técnicos deberán realizarse tratando de minimizar la producción de aerosoles

Barreras primarias (nivel II de bioseguridad)

Se recomienda el uso de ambos, delantales o uniformes de laboratorio a fin de evitar la contaminación de la ropa de calle.

Es imprescindible el uso de guantes

Se debe utilizar protección ocular para procedimientos en los que puedan ocurrir salpicaduras.

Se debe disponer de cámaras de seguridad biológica de clase II en las áreas de procesamiento inicial de materiales, estudios virológicos, cultivo de micobacterias, procesamiento de hemocultivos y estudios micológicos (Figura 1). Se deberá considerar trabajar en la cámara de seguridad cuando se estén manipulando microorganismos que así lo requieran (*Brucella* spp., *Neisseria meningitidis*, etc.).

El mantenimiento y control de las cámaras deberá realizarse cada 6 meses por personal especializado.

El cambio de los filtros deberá realizarse en forma semestral.

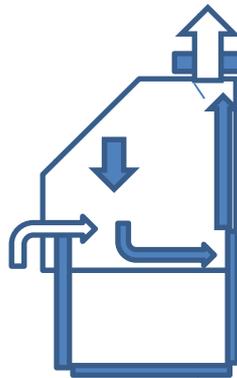


Figura 1. Esquema de funcionamiento de una cámara de seguridad biológica de tipo II.



Figura 2. Cámara de seguridad biológica de tipo II.

Barreras secundarias

Los laboratorios deben estar diseñados para que su limpieza sea sencilla. Las superficies de las mesas de trabajo deben estar impermeabilizadas y ser resistentes al calor moderado.

Cada laboratorio debe tener una pileta para el lavado de manos.

Capacitación del personal

La capacitación del personal se realiza en el marco de un programa más amplio de capacitación en todos los aspectos del laboratorio.

- 1) Se entregará una copia del manual de Bioseguridad a cada una de las personas que trabaje en el laboratorio.
- 2) Se efectuará al menos una reunión anual destinada al tema.
- 3) Se estimulará la participación de personal del laboratorio en cursos o talleres vinculados al tema.

Bibliografía específica

- Ballester D, Beer L, Botto L, Casimiro AM, Cerdá N, Latapié L, Valdez I, Glaser de Makler R. Niveles de riesgo y condiciones de bioseguridad en el laboratorio clínico. Coordinadora: Ana María Casimiro, Subcomisión de Bioseguridad, Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, 2005.
- Barkley WE. Containment and disinfection. En: Gerhardt P., Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (ed.), p.487-503. Manual of Methods for General Bacteriology. ASM Press, Washington DC, 1981.
- Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC-NIH, 5th ed., Atlanta GA, EE.UU, 2007.
- Coto CE, Lucero NE. Bioseguridad en el Laboratorio. Documento del Simposio sobre Bioseguridad, V Congreso Argentino de Microbiología, 1988, publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Supl 4, 1988.
- Lucero NE. Bioseguridad en el Laboratorio II. Documento del Grupo de Trabajo "Bioseguridad: un lenguaje compartido", III Congreso Argentino de Virología, 1990, publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Supl. 1, 1990.
- Minister of Health Population and Public Health Branch Centre for Emergence Preparedness and Response. The laboratory biosafety guidelines, 3a ed., Canadá, 2004.
- OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. (3a ed.) 2005.
- Richmond JY, Mc Kinney RW. Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomedicina. CDC-NIH, 4ta ed., Atlanta, GA, EE.UU., 2004.

CAPÍTULO 3

El microscopio

Enfoque correcto del microscopio óptico

Para una visión correcta del preparado es importante tener el campo visual iluminado en forma uniforme.

La imagen debe ser brillante, pero sin reflejos o deslumbramiento.

Características esenciales del microscopio

Debe poseer una lámpara con colector y diafragma iris de campo luminoso (diafragma de la lámpara).

La pupila del objetivo debe estar iluminada.

Debe tener condensador centrable y deslizante verticalmente

Enfoque según Köhler

Con el diafragma iris de la lámpara abierto (el microscopio debe ser apto para el enfoque según Köhler) y el condensador subido completamente y con la lente frontal introducida, se enfoca la preparación con objetivo de 10X. Observar cerrando el diafragma de la lámpara, centrando el haz de luz con el movimiento del condensador (con los tornillos *ad hoc*). Bajar el condensador hasta obtener la máxima nitidez posible de la imagen del diafragma (frecuentemente hexagonal). Centrar el haz de luz con los tornillos del condensador.

Abrir el diafragma de la lámpara casi hasta el borde del campo visual. Centrarlo con exactitud y abrirlo hasta que desaparezca detrás del borde del campo visual.

Regular el contraste de la imagen con el diafragma del condensador. Para ello, sacar uno de los oculares y verificar por inspección visual que la abertura visible de dicho diafragma permita el paso de aproximadamente un 75% del haz de luz.

Regular la luminosidad de la imagen con filtros y/o con el regulador de voltaje de la lámpara.

Al cambiar de objetivo, sólo adaptar el diafragma de la lámpara al tamaño del campo visual y el diafragma del condensador como para que siga permitiendo el paso de un 75% del haz de luz.

Dificultades y errores

Queda el campo todo oscuro o con muy poca luz

- a) El revólver no está girado totalmente.
- b) El diafragma del condensador está totalmente cerrado o totalmente descentrado.

No se puede enfocar el preparado

- a) El cubreobjetos está hacia abajo.
- b) El cubreobjetos es muy grueso para un objetivo de gran aumento.
- c) Con objetivo de inmersión: El objetivo tiene en su lente frontal aceite de cedro endurecido que se ha olvidado de quitar. Con una gamuza mojada en xileno, se limpia sin hacer presión.

La imagen aparece velada y no se puede enfocar bien

- a) La lente frontal del objetivo está mojada o sucia.
- b) La lente superior del ocular está húmeda o sucia.
- c) Con objetivo de inmersión: Si el objetivo tiene diafragma para campo oscuro, debiera abrirse a su máximo valor.

Aunque el microscopio está enfocado, no se observan detalles

El diafragma del condensador está totalmente abierto. Cerrar hasta que pasen 2/3 o 1/4 del haz de luz.

El campo visual no está iluminado completamente

- a) Hay que abrir más el diafragma de la lámpara.
- b) Con objetivo de poco aumento: Hay que quitar la lente frontal del condensador.

En la imagen aparecen manchas.

- a) El diafragma del condensador está demasiado cerrado y se enfocan rayas o suciedades del cubre y del portaobjetos.
- b) Las lentes del ocular están sucias. Al girar el ocular, las manchas también se desplazan.

El movimiento del micrométrico no sigue más

- a) Ha llegado a su posición tope. Hay que llevarlo al medio y mover el macro.
- b) La grasa se ha endurecido.

La imagen enfocada sale por sí sola fuera de foco

- a) El movimiento del macro funciona demasiado laxamente y el tubo cae solo.

Aparecen burbujas de aire en la imagen

- a) Se quitan desplazando el preparado o pasando un pelo por el aceite entre la lente y el preparado.

Enfoque con microscopio de campo oscuro

Elementos necesarios

- a) Condensador para campo oscuro.
- b) Portaobjetos del espesor indicado en el condensador.
- c) Objetivo de apertura numérica 0,80 o provisto de diafragma, el que deberá regularse para obtener esa apertura numérica.

Centraje de la iluminación

- a) Cerrar el diafragma de la lámpara a unos 3 mm de diámetro.
- b) Se quita el filtro azul.
- c) Se quita el condensador, el ocular y el objetivo
- d) Se coloca una placa despulida en el tubo, la cual debe quedar iluminada uniformemente.

Centraje del condensador

- a) Se cambia el condensador por otro de campo oscuro.
- b) Se coloca una gota de aceite en la lente frontal del condensador cubriendo toda su superficie. Se coloca el preparado sobre la platina.
- c) Se levanta el condensador hasta que el aceite tome contacto con la parte inferior del portaobjetos y se extienda uniformemente.
- d) Se pone un objetivo de poco aumento (5 a 10X) y un ocular de 6 a 10X. Se verá una zona más luminosa en el campo.
- e) Se dirige esa zona al centro del campo con el dispositivo de centraje del condensador (tornillos).
- f) Se sube y se baja el condensador hasta que esa zona luminosa se reduzca al mínimo de tamaño y presente un borde nítido. Si se abre el diafragma de la lámpara aumentará el campo visual.

- g) Cambiar de objetivos y volver a centrar si fuera necesario.

Dificultades y errores

Campo completamente o parcialmente oscuro

1. No se puso aceite de inmersión entre el condensador y el portaobjetos o su cantidad es escasa.
2. El condensador está mal centrado.

No se consigue campo oscuro con el objetivo de inmersión

1. Se usó un cubreobjetos muy grueso.
2. Se usó un portaobjetos muy grueso.
3. Se olvidó de cerrar el diafragma del objetivo o se utilizó un objetivo de apertura numérica muy elevada.
4. El condensador está muy bajo o muy alto.

Aparecen manchas o rayas blancas

El cubre o el portaobjetos están rayados o sucios.

El campo se ve turbio

El preparado está incluido en aire o en una solución turbia.

El campo oscuro tiene poco contraste

Se olvidó de quitar el filtro azul colocado sobre la lámpara

Examen microscópico directo

Examen en fresco

Se observa con aumento de 400X parte de la muestra diluida o no en solución fisiológica entre porta y cubreobjetos. Se puede observar la muestra original o centrifugada (ver Parte IV, Capítulo 4, Diagnóstico microbiológico de la infección urinaria).

Examen previa coloración

Se realiza un extendido con una pequeña cantidad del material en estudio sobre un portaobjetos y una vez seco se lo fija con metanol (1 minuto). Lo habitual es la realización de la coloración de Gram,

pero también se pueden practicar las coloraciones de Ziehl-Neelsen, Kinyoun, May Grünwald-Giemsa, entre otras (ver Apéndice I, Coloraciones).

Se deberá informar la morfología (coco, bacilo o cocobacilo) y la disposición (pares, racimos, cadenas); su resistencia a la decoloración (bacilos ácido resistentes o ácido-alcohol resistentes), entre otras.

También pueden practicarse coloraciones fluorescentes: auramina-rodamina, naranja de acridina (ver Apéndice I, Coloraciones).

PARTE II

Etapas preanalíticas

CAPÍTULO 1

Instrucciones al paciente, toma, conservación y procesamiento inicial de las muestras destinadas al estudio microbiológico

Las instrucciones para los pacientes, la información requerida de los mismos y los distintos procedimientos de toma de muestras se detallarán más adelante, en cada uno de los capítulos correspondientes al procesamiento de los diferentes materiales clínicos. Aquí sólo se darán recomendaciones de carácter general y se colocarán en una tabla las condiciones de recolección, transporte y conservación de las principales muestras que se reciben en un laboratorio de Microbiología Clínica (Tabla 1).

Datos mínimos del paciente

Se confeccionarán protocolos de pedido para cada tipo de muestra. En el cuadro 1 se mostrarán los datos mínimos que deberán acompañar a todas las muestras.

Recomendaciones generales para la obtención y transporte de las muestras destinadas al diagnóstico microbiológico

1. Se debe evitar la contaminación del material obtenido con la microbiota saprófita del paciente.
2. El material recogido debe ser representativo del proceso infeccioso por lo tanto es importante obtener un volumen suficiente de muestra para que permita realizar el examen en su totalidad: microscopía, cultivo, estudios complementarios, métodos moleculares, etc.

Cuadro 1. Protocolo de pedido de muestras destinadas al diagnóstico microbiológico

Nombre y apellido del paciente		Fecha		Hora de recolección
Edad	Sexo		No. de historia clínica	
Tipo de muestra				
Modo de obtención de la muestra				
Enfermedad actual				
Enfermedad de base				
Administración previa de antibióticos (cuáles)				
Observaciones				
Búsqueda de gérmenes comunes	Virus (cuáles)	Hongos (cuáles)	Micobacterias	Anaerobios

En lo posible, se debe recoger el material antes de que se inicie la terapéutica antimicrobiana. Si esto no fuera posible, deberá exigirse que se detalle el tratamiento recibido por el paciente (antibiótico administrado y momento de la última dosis)

3. Según el tipo de muestra, se recogerá en recipiente estéril, de tapa a rosca o en medio de transporte (Cary-Blair). Para búsqueda de anaerobios conviene utilizar un frasco con medio de transporte anaeróbico (Transporte Anaeróbico Britania, Laboratorios Britania, Buenos Aires).

4. Las muestras deben enviarse rápidamente al laboratorio. En caso contrario, se deben refrigerar o dejar a temperatura ambiente según corresponda.

5. La muestra se debe remitir con todos los datos del paciente, ya que el modo de procesamiento o la interpretación de los resultados varían en cada caso.

Pus de abscesos o empiemas

Se efectúa la punción y según el caso, con el líquido obtenido se inocula un frasco de transporte anaeróbico (por ejemplo, Transporte Anaeróbico Britania[®], Laboratorios Britania, Buenos Aires) o se lo vuelca en un tubo seco estéril de tapa a rosca.

Fuera del horario de actividad del laboratorio de Microbiología, si se dispusiera de volumen suficiente, es conveniente también sembrar un frasco de hemocultivos. En el caso de líquidos articulares de pacientes pediátricos, es especialmente útil para la recuperación de *Kingella kingae*. Nunca utilizarlo como única muestra.

Las muestras se deben dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Punción aspiración de heridas o celulitis

Se efectúa la punción del borde externo de la herida o del área de celulitis y, según el caso, por piel sana, se inyecta un volumen mínimo de solución fisiológica estéril y con el líquido de lavado obtenido se inyecta un frasco de transporte anaeróbico (por ejemplo, Transporte Anaeróbico Britania[®], Laboratorios Britania, Buenos Aires) o se lo vuelca en un tubo seco estéril de tapa a rosca. La muestra se debe dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Si se requiere el estudio de anaerobios, es indispensable el uso del frasco para transporte anaeróbico.

Hisopados nasales para búsqueda de portadores

Tomar muestra de ambas narinas, introduciendo un hisopo estéril y rotándolo. El hisopo, luego, se debe introducir en un tubo con solución fisiológica. La muestra se debe dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Hisopados axilares, perianales o rectales para búsqueda de portadores

Tomar muestra pasando un hisopo estéril por ambas axilas (axilar), por el margen anal-piel (perianal) o en el caso de hisopados rectales introducirlo en el recto. El hisopo, luego, se debe introducir en un tubo con solución fisiológica o medio de transporte, según el caso. La muestra se debe dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Materiales para el estudio de microorganismos anaerobios

Se buscan bacterias anaerobias en biopsias y materiales obtenidos por punción aspiración, remitidos inmediatamente o inoculados en frascos de transporte anaeróbico (por ejemplo, Transporte Anaeróbico Britania -T.A.B.[®], Laboratorios Britania, Buenos Aires). La muestra tomada por punción aspiración debe ser introducida en este frasco en forma estéril, eliminando previamente el aire de la jeringa. Esta forma de conservación permite mantener viables tanto bacterias anaerobias como anaerobias facultativas por un lapso de hasta 24 horas. Mantener el frasco a temperatura ambiente.

Tabla 1. Recolección, transporte y conservación de las muestras

Tipo de muestra	Recipiente	Condiciones de conservación
Urocultivo	Frasco estéril tapa a rosca	Heladera a 4° C
Punción suprapúbica	Frasco o tubo seco estéril tapa a rosca	Heladera a 4° C
Coprocultivo	Hisopo sumergido en medio de transporte Cary Blair Materia fecal recién emitida en frasco estéril con tapa a rosca	Temperatura ambiente Temperatura ambiente
Toxinas de <i>Clostridium Difficile</i>	Frasco estéril con tapa a rosca	Congelador a -4 ° C o freezer
Hemocultivo	Dos frascos, uno aeróbico y otro anaeróbico	A temperatura ambiente o estufa de 37° C
Hemocultivo + catéter	Fracos de hemocultivo aeróbicos y catéter en tubo estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente o estufa de 37° C
Hemocultivo recuento Diferencial	Fracos de hemocultivos y tubos con 2 ml de sangre periférica y sangre obtenida a través del catéter, en tubos estériles con heparina o SPS	A temperatura ambiente o estufa de 37° C
Hisopado de fauces	Hisopo en tubo con solución fisiológica, en tubo seco o en tubo con medio de transporte	A temperatura ambiente
Punción de oído o senos paranasales	T.A.B. o tubo seco estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente
Esputo	Frasco estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente

Tipo de muestra	Recipiente	Condiciones de conservación
Lavado broncoalveolar	Frasco estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente
Líquidos de punción	Tubo estéril con tapa a rosca o T.A.B	A temperatura ambiente
LCR	Tubo seco estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente
Hisopados de heridas	Hisopo en medio de transporte	A temperatura ambiente
Punción aspiración de Herida	Tubo estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente
Biopsias	Tubo seco estéril con tapa a rosca	A temperatura ambiente
Poder bactericida del suero	No menos de 2 ml de sangre en tubo estéril de centrifuga y con tapa a rosca	A temperatura ambiente

PARTE III

Microorganismos productores de patología en el hombre

CAPÍTULO 1

Cocos gram positivos

Introducción

Fue a fines del siglo XIX cuando se describieron cocos que se disponían en cadenas en los medios líquidos o en los materiales clínicos originales (estreptococos, del griego *streptos* = cadena) y otros que lo hacían en tetradas o racimos (estafilococos, del griego *staphylos* = racimo).

Con la popularización de la coloración de Gram pudo establecerse, que tanto unos como otros tomaban el violeta de Genciana y no se decoloraban con alcohol-acetona, es decir, eran gram positivos. Posteriormente, se observó que esta morfología era bastante coincidente (aunque no universalmente) con la reacción de uno y otro tipo de bacterias con el agua oxigenada en la prueba de catalasa. Los estafilococos eran catalasa positivos y los estreptococos, catalasa negativos.

Estafilococos y bacterias relacionadas

Los cocos gram positivos catalasa positivos pertenecían a la familia *Micrococcaceae*. Se destacaban tres géneros de importancia clínica, aunque *Staphylococcus* era por lejos el más frecuentemente recuperado de materiales clínicos humanos:

Staphylococcus

Micrococcus

Rothia (Stomatococcus) [catalasa-variable].

Actualmente *Staphylococcus* junto con otros géneros menos conocidos y *Gemella*, fueron incluidos en la familia *Staphylococcaceae*. Independientemente de su *status* taxonómico, en Microbiología Clínica nos interesa diferenciar el género *Staphylococcus* de otras bacterias con las cuales puede confundirse. Así construimos la tabla 1, donde podemos ver pruebas diferenciales de los cocos gram positivos, catalasa positivos.

Cuadro 1. Prueba de la catalasa en tubo y en portaobjetos

Prueba de la catalasa:	
$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Catalasas
El agua oxigenada y el anión superóxido son productos terminales o intermedios de la degradación aeróbica de los azúcares. Las catalasas se encargan de eliminar estos intermediarios tóxicos para la bacteria. Otras enzimas también pueden actuar en estos procesos:	
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}$	Peroxidasas.
$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Superóxido dismutasa (SOD)
SOD	Catalasa

Micrococcus spp. y *Rothia mucilaginosa* son microorganismos generalmente contaminantes de origen cutáneo, de bajo poder patógeno y, por lo tanto, cuando se los aísla de materiales clínicos deben considerarse contaminantes hasta que se demuestre lo contrario. No obstante, pueden producir infecciones a partir de catéteres venosos o bacteriemias en pacientes inmunocomprometidos, pero su frecuencia es sumamente escasa.

Los microorganismos del género *Staphylococcus*, por el contrario, se encuentran a la cabeza como gérmenes prevalentes en muchos tipos de infecciones.

Recientemente se han definido otros géneros, de menor importancia clínica: *Macrococcus*, *Kocuria* y *Kytococcus*, estos dos últimos como desprendimientos del género *Micrococcus*.

Tabla 1. Identificación a nivel de género de los cocos gram positivos catalasa positivos

Género	Movilidad	CINa 6,5%	Oxidasa modificada*	Bacitracina
<i>Staphylococcus</i>	-	+	-	R
<i>Micrococcus</i>	-	+	+	S
<i>Rothia mucilaginosa</i> **	-	-	-	S
<i>Planococcus</i>	+	+	ND	ND
<i>Macrococcus</i>	-	+	+	R
<i>Kocuria</i>	-	+	+	S
<i>Alloiococcus</i> **	-	+	-	ND

V = variable ; ND = no determinado; * se utiliza el clorhidrato de tetrametil-parafenilendiamina

**catalasa variable.

Cuadro 2. Pruebas destinadas a la identificación de estafilococos a nivel de género

<p>2a. Bacitracina</p> <p>Consiste en efectuar una prueba de sensibilidad a este antibiótico por el método de difusión, utilizando un disco de 0,04 UI de bacitracina.</p> <p>Cualquier halo de inhibición se interpreta como "sensible".</p> <p>Cuando se efectúa con estreptococos debe emplearse agar sangre como medio de cultivo.</p>
<p>2b.Tolerancia al NaCl al 6,5%.</p> <p>Ver cuadro 8, más adelante.</p>
<p>2c. Movilidad</p> <p><i>Fundamento:</i> Existen bacterias móviles y otras que no lo son.</p> <p><i>Limitaciones:</i> La movilidad puede ser termosensible, manifestarse sólo en determinados estadios del desarrollo bacteriano (generalmente en la fase logarítmica, e incluso en algunos casos se observan variantes no móviles a partir de cepas móviles, que aparentan ser estables).</p> <p><i>Método microscópico:</i> Se prepara una suspensión bacteriana que no manifieste turbiedad en un caldo nutritivo. Se incuba a temperatura ambiente hasta que empiece a notarse turbiedad. Se toma una gota y se observa entre porta y cubreobjetos con 400X. Se ven elementos móviles. El movimiento debe aparecer como "voluntario" y no se debe confundir con el movimiento browniano de cualquier partícula en suspensión.</p> <p><i>Movilidad en medio semisólido:</i> Se inocula un tubo con medio semisólido (p.ej. SIM) con ansa recta. Se deja incubar una noche a la temperatura deseada (preferentemente 30°C o temperatura ambiente).</p> <p>Movilidad positiva = se ve una zona turbia alrededor de la línea de inoculación.</p>
<p>2d. Oxidasa</p> <p><i>Fundamento:</i> La prueba se basa en que hay bacterias que producen una oxidasa intracelular. Esta reacción se debe a un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación de un citocromo reducido por el oxígeno molecular, el cual a su vez es aceptor de un electrón en la etapa terminal del sistema de transferencia electrónica.</p> <p style="text-align: center;">Citocromooxidasa</p> <p>La reacción es: $2 \text{ citocromo c reducido} + 2 \text{ H}^+ + 1/2 \text{ O}_2 \longrightarrow 2 \text{ citocromo c oxidado} + \text{ H}_2\text{O}$</p> <p>Una reacción positiva consiste en una serie de reacciones con un componente autooxidable del sistema citocromo como catalizador final. Se utilizan sustratos artificiales como aceptores de electrones: Por ejemplo, clorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. Estos sustratos son poco coloreados o incoloros y la reacción final produce compuestos fuertemente coloreados.</p> <p style="text-align: center;"> $(\text{CH}_3)_2 \text{ N} - \text{C}_6 \text{ H}_4 - \text{N} (\text{CH}_3)_2$ $(\text{CH}_3)_2 \text{ N}^+ = \text{C}_6 \text{ H}_4 = \text{N}^+ (\text{CH}_3)_2$ </p> <p style="text-align: center;">citocromo c / O₂ oxidado</p> <p>Incoloro \longrightarrow Azul</p> <p><i>Procedimiento:</i> Se impregna un papel de filtro con la solución del reactivo, se toma una colonia del microorganismo a ensayar con un palillo de madera o de plástico. Se observa el cambio de color dentro de los 10 - 15 segundos.</p>

Los estafilococos se clasifican en coagulasa positivos y coagulasa negativos, de acuerdo a una prueba bioquímica, la coagulasa (Fig. 1).

En clínica humana, el término coagulasa positivo es casi sinónimo de *Staphylococcus aureus*, aunque no es así en veterinaria, donde también suelen encontrarse estafilococos de otras especies que dan positiva la prueba de coagulasa (Tabla 2).



Figura 1. Prueba de la coagulasa en tubos. Tubo superior = coágulo evidente, prueba positiva.
Tubo inferior = no se formó el coágulo, prueba negativa.

La coagulasa puede realizarse de dos maneras: en tubo o en portaobjetos. Este último método es menos específico para *S.aureus* (Tabla 2) y lo que pone de manifiesto es la presencia del factor de agregación o *clumping factor* y no la coagulasa. En la prueba en tubos se pone de manifiesto la coagulasa libre. Se trata de una proteína antigénica² y termoestable. Reacciona con una sustancia plasmática llamada factor de reacción de la coagulasa o CRF. Ésta es una molécula derivada de la trombina que forma un complejo con la coagulasa libre extracelular. Indirectamente, induce la conversión de fibrinógeno en fibrina (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Pruebas de la coagulasa y DNasa

a. Coagulasa en tubo:

CRF + coagulasa libre → complejo CRF - coagulasa

Complejo CRF - coagulasa + fibrinógeno → coágulo de fibrina.

b. DNasa a 37 °C o termonucleasa

Se utiliza un medio deshidratado comercial (agar DNA) cuya composición es la siguiente (en g/L):

² Antígeno: Sustancia que inyectada a animales o al hombre es capaz de generar anticuerpos.

Extracto de carn.....	5,00
Peptona de caseína.....	10,00
Peptona de carne.....	5,00
NaCl	5,00
ADN.....	2,00
Agar.....	15,00
pH final a 37° C.....	7,50

Fundamento: para determinar la producción de desoxirribonucleasa capaz de despolimerizar el ADN se aprovecha la propiedad del ADN intacto de precipitar en medio ácido.

Efectuando la prueba de DNasa a 37 °C podemos reconocer las dos subespecies de *S. aureus* con gran seguridad pues *S. hyicus* y *S. intermedius* son patógenos animales. En caso de infecciones con exposición a animales (por ejemplo, mordeduras), es necesaria la realización de pruebas adicionales (tabla 2).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus desarrolla muy bien en agar sangre en forma de colonias ligeramente elevadas, frecuentemente β-hemolíticas y casi siempre con un pigmento amarillo cremoso (Figura 2).

Tabla 2. Especies de estafilococos que dan positiva la prueba de coagulasa

Espece	Coag. en porta	Coag. en tubo	DNasa a 37°C	β-GLU	ARG	β-GUR	β-GAL
<i>S.aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> ¹	-	+	+	-	ND	-	-
<i>S.aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ²	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>S.schleiferi</i> subsp. <i>Coagulans</i>	-	+	+	ND	+	ND	ND
<i>S.schleiferi</i> subsp. <i>Schleiferi</i>	+	-	+	-	+	-	-

<i>S.lutrae</i>	-	+	+	ND	-	ND	+
<i>S.hyicus</i>	-	V	+	V	+	+	-
<i>S.intermedius</i>	V	+	+	V	V	-	+
<i>S.delphini</i>	-	+	-	ND	+	ND	ND

¹Catalasa negativo

² Sólo *S.aureus* subsp *aureus* produce acidez del manitol.

Coag.: coagulasa; β -GLU: beta-glucosidasa; β -GUR: beta-glucuronidasa; β -GAL: beta-galactosidasa; ARG: arginina dihidrolasa

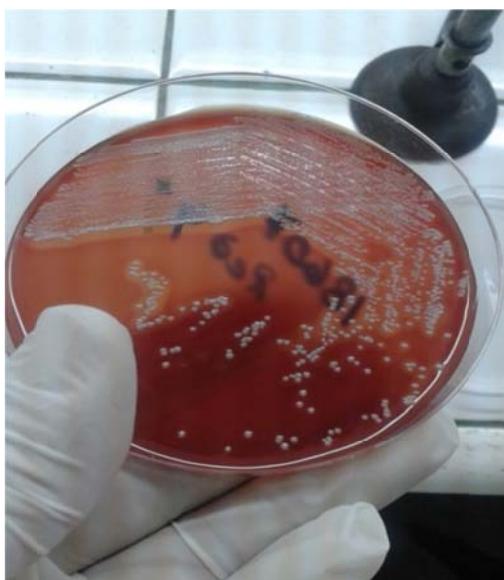


Figura 2. Colonias de *Staphylococcus aureus* en agar sangre.

Por su poder patógeno, aparece tanto en infecciones primarias como secundarias a cirugía, traumatismos, cuerpos extraños o en huéspedes debilitados. Es un microorganismo que se puede encontrar involucrado tanto en infecciones nosocomiales como en aquellas contraídas en la comunidad.

Como patógeno primario produce infecciones leves como foliculitis (infección de la base del pelo), forúnculos (cuando toma estructuras más internas), abscesos subcutáneos (cuando llega al tejido celular subcutáneo). A veces penetra por pequeñas escoriaciones de la piel o mucosas y puede originar bacteriemias (presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo) y de allí puede impactar en una articulación (artritis), en algún hueso (osteomielitis), en alguna válvula cardíaca (endocarditis aguda en válvula nativa). Su presencia en oído medio (otitis) y senos paranasales (sinusitis) es esporádica (es el tercero o cuarto germen, en porcentajes muy inferiores a *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*). Al tratarse de un colonizante frecuente de piel y mucosas, también juega el rol de oportunista, infectando heridas diversas, prótesis, sitios de inserción de catéteres, sondas urinarias, etc.

Su poder patógeno está dado básicamente por una variedad de enzimas que le facilitan la penetración de los tejidos: DNasa, hialuronidasa, condroitinsulfatasa, entre otras, y por toxinas, entre las que se destacan la exfoliatina, responsable del síndrome de piel escaldada en neonatos³ y la toxina del síndrome de *shock* tóxico estafilocócico (TSST-1)⁴. Actualmente ha cobrado importancia la toxina de Pantón y Valentine que es una leucocidina responsable de, entre otras cosas, la producción de neumonía necrotizante.

***Staphylococcus* spp. coagulasa negativos**

Los estafilococos coagulasa negativos comprenden numerosas especies. Las más importantes en patología humana son las que se ven en la tabla 3. Su diferenciación puede lograrse con un esquema de cinco pruebas descrito por De Paulis y Col. A posteriori, si fuera necesario, se podrían realizar algunas pruebas adicionales para llegar a especie.

Todas estas especies, excepto *S. saprophyticus*, son patógenos oportunistas que pueden producir sepsis en las salas de Neonatología, infecciones relacionadas a catéteres, sondas o prótesis, generalmente silentes, solapadas, pero que pueden terminar en efectos indeseables como la disfunción de válvulas de derivación del líquido cefalorraquídeo en pacientes hidrocefálicos, reemplazo de prótesis de cadera o endocarditis tardía de válvula protésica. *Staphylococcus lugdunensis* tiene un comportamiento diferente, porque si bien mantiene su rol de oportunista, puede llegar a producir infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares y endocarditis entre otras, en pacientes previamente sanos.

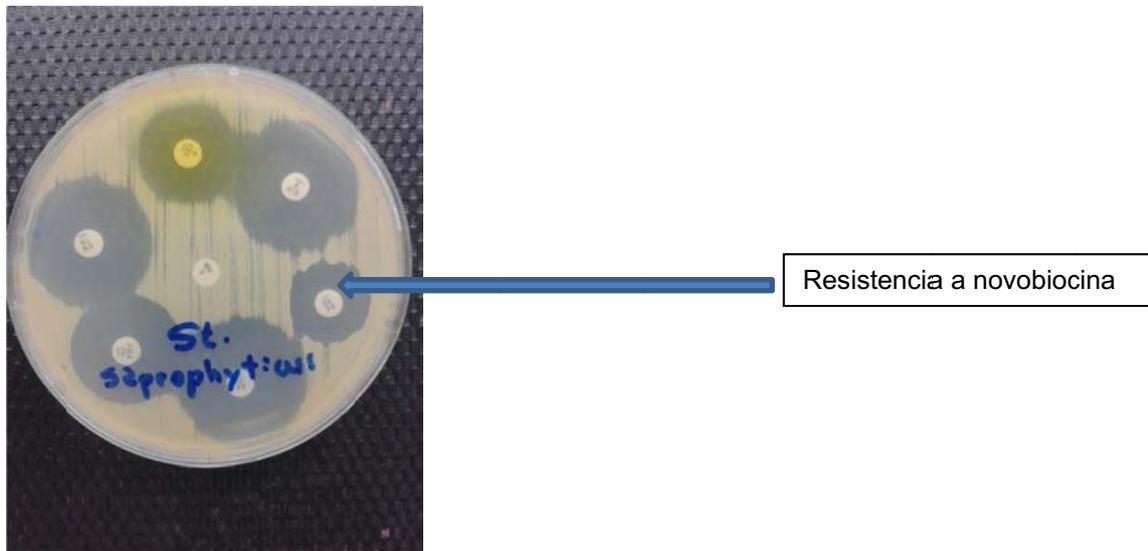


Figura 3. Antibiograma típico de un aislamiento de *Staphylococcus saprophyticus*

³ El microorganismo se encuentra localizado en algún sitio, pero la toxina se disemina y produce la descamación de la piel, como si el niño se hubiera quemado con agua caliente.

⁴ El individuo tiene efectos sistémicos como fiebre, descamación e hipotensión que pueden derivar a un shock y a la muerte.

S. saprophyticus es un patógeno primario, ya que produce muy frecuentemente infecciones urinarias en mujeres jóvenes previamente sanas (segundo o tercer germen en frecuencia). Se caracteriza especialmente por su resistencia a la novobiocina (Fig 3, Tabla 3).

Tabla 3. Especies de estafilococos coagulasa negativos más frecuentemente encontradas en clínica humana y pruebas bioquímicas básicas para su identificación según De Paulis y col.

Especies	Nov*	U	MAN	PYR	ODC
Grupo <i>S. epidermidis</i>	S	+	+	-	v
Grupo <i>S. haemolyticus</i>	S	-	-	+	-
Grupo <i>S. saprophyticus</i>	R	+	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	S	V	+	+	+
Grupo <i>S. warneri</i>	S	+	-	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	S	-	+	+	-
<i>S. simulans</i>	S	+	v	+	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	S	-	+	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	R	-	v	-	-
Grupo <i>S. cohnii</i>	R	+	+	v	-

En negrita se indicaron las especies más frecuentes. Nov: sensibilidad a novobiocina, U: ureasa, MAN: fermentación de D-manosa, PYR: pirroldonilarilamidasa; ODC: ornitina descarboxilasa; v: variable; S: sensible, R: resistente
 * ≤11mm = resistente; ≥12 sensible, sólo desde el punto de vista taxonómico.

Cocos gram positivos, catalasa negativos

Si bien los patógenos más importantes de este grupo (enterococos y estreptococos) se disponen en cadenas, existen otros que lo hacen en tétradas y/o racimos. Esta disposición debe valorarse sólo cuando estas bacterias se encuentran en el material clínico original o en un caldo de cultivo. La disposición que toman cuando los extendidos se efectúan a partir de colonias crecidas en medio sólido no debe tomarse en cuenta.

La hemólisis en agar sangre es otra de las características iniciales de las que parte el microbiólogo para orientar su esquema de identificación, además de la catalasa y las cadenas.

Cuando se introdujeron los medios con base de agar, pronto se observó que el agregado de sangre permitía el desarrollo de algunos microorganismos más exigentes y a la vez podía observarse la alteración que el microorganismo producía sobre los glóbulos rojos.

En 1919 Brown clasificó los tipos de hemólisis en alfa, alfa prima, beta y gamma.

Cuadro 4. Tipos de hemólisis

Alfa (α): hemólisis parcial, que deja algunos glóbulos intactos cerca de la colonia y un halo verdoso alrededor de la colonia (Figura 4).

Alfa prima (α'): hemólisis parcial, que deja algunos glóbulos intactos cerca de la colonia, pero no deja glóbulos en una zona un poco más alejada. A ojo desnudo parece una hemólisis total pues un halo verdoso muy pegado a la colonia, suele confundirse con parte de la misma.

Beta (β): hemólisis total, que no deja glóbulos alrededor de la colonia, quedando el medio totalmente transparente (Figuras 5 y 7).

Gamma (γ): ausencia de hemólisis (Figura 6)

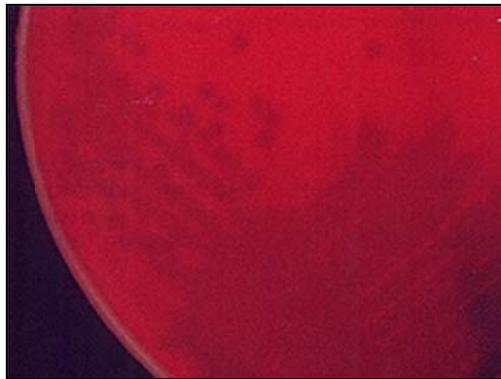


Figura 4. Hemólisis alfa (hemólisis parcial – color verde)

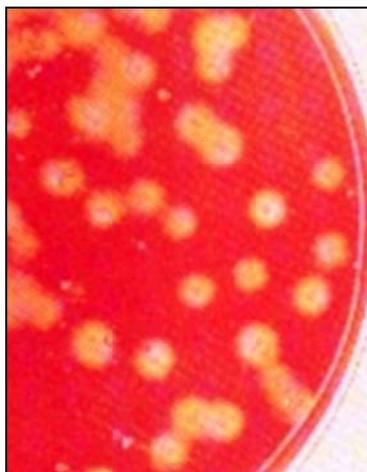


Figura 5. Hemólisis beta (hemólisis total)

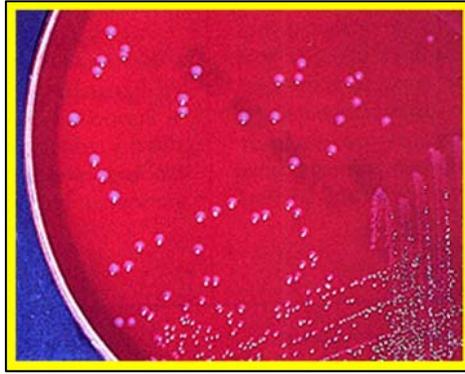


Figura 6. Hemólisis gamma (ausencia de hemólisis)

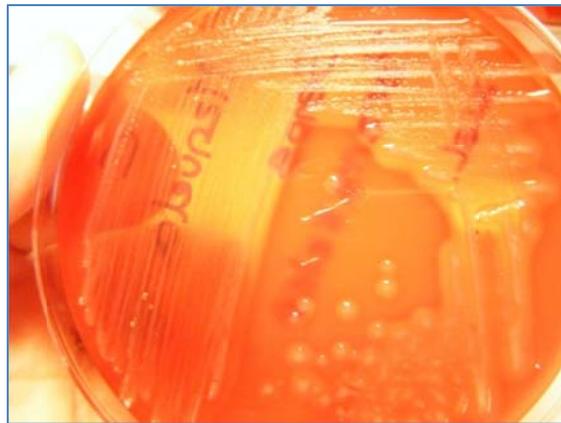


Figura 7. Colonias beta-hemolíticas (hemólisis total) pertenecientes a una cepa mucosa de *Streptococcus pyogenes*

La hemólisis depende de:

(1) **La composición del medio de cultivo**, y dentro de ella de:

(a) *La naturaleza de la sangre con que se prepara el agar sangre*

Se ha trabajado históricamente con sangre humana, ovina, bovina, equina o de conejo. No obstante, al registrarse diferencias se prefirió normalizar el uso de la **sangre ovina**.

(b) *La naturaleza del medio basal con que se prepara el agar sangre*

Éste debe ser un **medio exento de carbohidratos como agar tripteína de soja o agar Columbia**. Por lo tanto no debe usarse agar infusión cerebro corazón, que contiene glucosa ni agar Mueller Hinton que contiene almidón. Los carbohidratos, cuando son utilizados por las bacterias, se transforman en metabolitos ácidos y el descenso consiguiente del pH determina la inhibición de las hemolisinas, que son las enzimas responsables de la producción de hemólisis.

(c) *La proporción de sangre agregada*

Más del 10% puede hacer parecer ausencia de hemólisis cuando en realidad la hay y por el contrario, menos del 3% puede hacer simular una β -hemólisis cuando en realidad es alfa. **El porcentaje correcto es de 5 a 7% de sangre.**

(2) La atmósfera de incubación.

Hubo muchas discusiones acerca de la conveniencia de incubar las placas de agar sangre en uno u otro tipo de atmósfera. La atmósfera anaeróbica, que es la que permite el desarrollo de una hemólisis de mayor intensidad, favorece la producción de β -hemólisis por bacterias normalmente α -hemolíticas como *Streptococcus pneumoniae*. La microaerobiosis, que parecería ser la atmósfera ideal, adolece del defecto de poder inhibir la hemólisis de algunas bacterias por la formación de peróxidos al reaccionar ciertos compuestos con el CO_2 y el oxígeno atmosférico. Es por ello que se prefiere la **atmósfera normal y fomentar el desarrollo subsuperficial de colonias a través de cortes producidos con el ansa en el agar sangre** o utilizar cubreobjetos que reduzcan la concentración de oxígeno sin aumentar la de dióxido de carbono.

Si bien la mayor parte de los microorganismos de importancia clínica pertenecientes a este grupo forman cadenas en medio líquido, es imperativo realizar la observación microscópica luego de un desarrollo en caldo tioglicolato de todo coco gram positivo catalasa negativo. De esta manera, se podrán individualizar algunos géneros menos frecuentes.

Colonias β -hemolíticas

Si se trata de microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* (cocos gram positivos, catalasa negativos, que forman cadenas en caldo tioglicolato o en los extendidos realizados con los materiales clínicos), las pruebas esenciales son PYR (Cuadro 5, Fig.8) y sensibilidad a bacitracina (Cuadro 2, Fig. 8). Si ambas fueran positivas, se trataría de *Streptococcus pyogenes* y la prueba de látex para determinar su grupo sería positiva para grupo A.

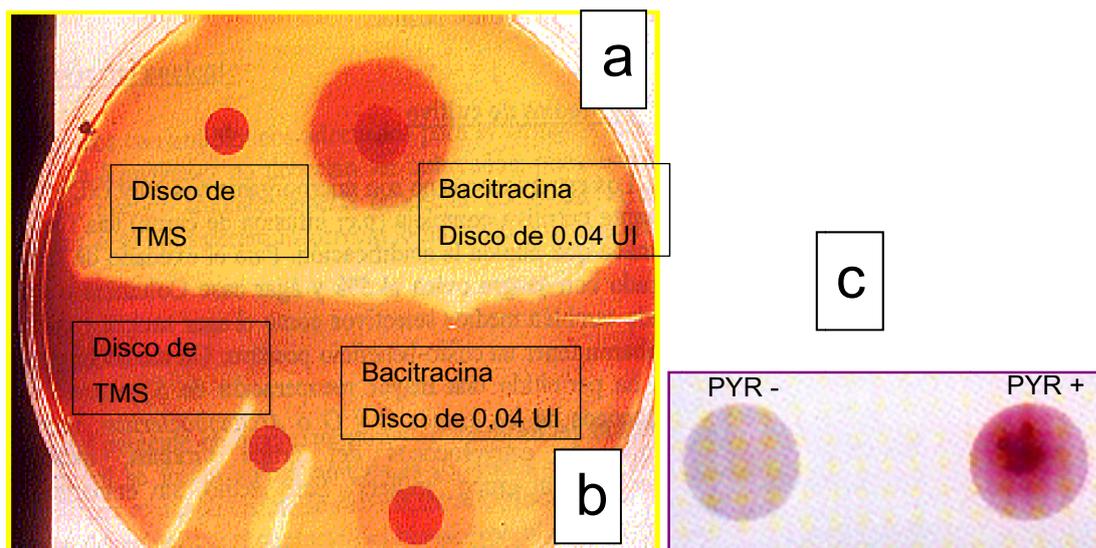


Figura 8. Pruebas de la bacitracina [(a) cepa con hemólisis beta normal, (b) cepa deficiente en estreptolisina S (lábil al oxígeno)] y (c) PYR. Cualquier tamaño de halo de inhibición debe considerarse como positivo. Nótese el aumento de la hemólisis en las estrías subsuperficiales. El disco de trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), que se ve en la figura, actualmente está en desuso porque no siempre las cepas de *S. pyogenes* resultan resistentes.

Tabla 3. Identificación preliminar de los estreptococos β-hemolíticos

Pruebas	Especie	Serología
BAC S PYR +	<i>S. pyogenes</i>	Grupo A
BAC R PYR +	Fenotipo raro de <i>S. pyogenes</i>	Grupo A
BAC S PYR -	Otras especies	Otros grupos o no serotipificable ^{1,2}
BAC R PYR -	Otras especies	Otros grupos o no serotipificable ^{1,2,3}

¹Serología C o G: colonias grandes con hemólisis similar a la del grupo A, Voges Proskauer negativas, beta-glucuronidasa positivas, trehalosa positivas, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

²Serología F o no tipificables: colonias pequeñas con un gran halo de hemólisis y olor a caramelo, *Streptococcus* spp. del grupo *S. anginosus* (a veces pueden aglutinar con antisueros A, C o G).

³Serología B: *Streptococcus agalactiae*, BAC R PYR.

Los grupos serológicos corresponden a la reactividad con antisueros específicos contra antígenos de pared (polisacárido C), como lo estableciera Rebecca Lancefield a mediados de la década del '30. Hay serotipos que van desde la A hasta la V, aunque algunos de ellos como el D, no corresponden al polisacárido C, sino a ácidos teicoicos de la pared. Los más frecuentemente implicados en la clínica, exceptuando el D, que no produce β-hemólisis en agar sangre de carnero, son el A, el B, el C, el F y el G.

Para confirmar que un estreptococo del grupo B es *S. agalactiae*, se efectúan las pruebas de hipurato (cuadro 6 y Fig. 9) y CAMP (cuadro 7 y Fig. 10) que van a resultar positivas. La efectividad de cada tipo de sangre en la visualización de la prueba de CAMP depende de la relación lecitina: esfingomielina. La mejor es la de origen ovino (relación 1 : 12, vs. por ejemplo la humana, o de conejo, relación 3 : 2).

Cuadro 6. Prueba del hipurato

El hipurato es la benzoilglicina. Esta molécula puede ser degradada a ácido benzoico + glicina por acción de la enzima llamada hipuricasa, presente en *S. agalactiae*, aunque también en algunas cepas de enterococos, estreptococos del grupo viridans y *Listeria*, que son bacilos cortos gram positivos con características similares a las de *S. agalactiae*. Producen patología neonatal, la morfología de las colonias es similar (colonias grandes de consistencia butirosa y con un pequeño halo de beta-hemólisis en agar sangre de oveja). Su diferencia principal estriba en que *Listeria* tiene forma bacilar, es catalasa positiva y presenta una movilidad característica (ver más adelante)

hipurato (benzoilglicina) → ácido benzoico + glicina

Se utiliza una solución de hipurato de sodio al 1%, a la que se agrega un inóculo denso de la bacteria en estudio.

La glicina puede detectarse con el agregado de ninhidrina (1h después de incubarse la prueba a 37°C) por aparición de un color violeta intenso a los 15 minutos (Fig. 9).

El método clásico es el del caldo hipurato que debe leerse después de 48 h de incubación a 37°C con el agregado de cloruro férrico. Con éste, el ácido benzoico forma un complejo de color marrón oscuro que se ve en forma de precipitado.

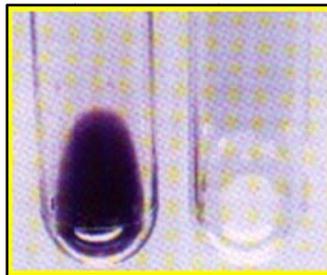


Figura 9. Prueba del hipurato. Tubo de la izquierda: reacción positiva.

Cuadro 7. Prueba de CAMP.

El factor CAMP es una proteína de bajo peso molecular (23.500 D) que actúa en forma sinérgica con la β -lisina estafilocócica sobre los eritrocitos de oveja para producir su lisis completa.

El nombre se debe a las iniciales de los autores que la describieron por primera vez: **Christie, Atkins** y **Munch-Petersen**

Medio: Usar agar Columbia + 5% de sangre ovina (o en su defecto de buey). Cualquier otro tipo de sangre no permitirá que se produzca esta reacción.

Cepa de estafilococo a utilizar: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Es una cepa productora de β -lisina. No utilizar cualquier otro aislamiento no chequeado previamente, pues la producción de β -lisina no se da en el 100% de las cepas de esta especie.

Procedimiento: Se efectúa una estría con el estafilococo y estrías perpendiculares que lleguen a 1 o 2 mm de la primera, con cepas de referencia y con la cepa problema. Se incuba a 37°C durante 18-24 h y se observa la aparición o no de un refuerzo de la hemólisis en forma de V (Fig.10).

Control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) (negativa)

Streptococcus agalactiae ATCC 12386 (positiva)

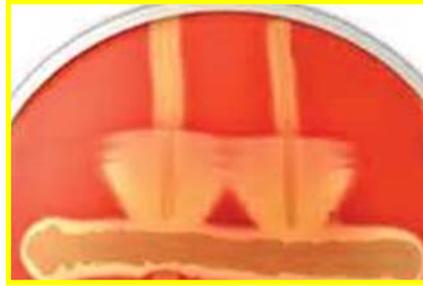


Figura 10. Prueba de CAMP.

***Streptococcus pyogenes* (grupo A)**

El único reservorio conocido de *S.pyogenes* en la naturaleza es la piel y las mucosas humanas. El grado de colonización, justamente, es más prevalente en el grupo etario más vulnerable, en relación a las faringitis: los niños en edad escolar. En ellos puede llegar a colonizar hasta en un 25-30% de la población.

Estructura

Cápsula

Algunas cepas de *S. pyogenes* poseen una cápsula gruesa de ácido hialurónico. Sus colonias aparecen como mucosas y se asocian comúnmente al serotipo M-18. La cápsula le confiere resistencia a la fagocitosis.

Pared celular

La pared celular presenta un esqueleto de peptidoglucano, con algunas moléculas de ácido lipoteicoico, de función desconocida, pero que facilitan la adherencia a las células epiteliales de la faringe.

Proteína M

Se han descrito más de 80 diferentes tipos de proteína M. Actualmente, la secuenciación de los genes que la codifican (*emm*) ha permitido reconocer más de 200 posibles serotipos. La proteína es como una doble cadena en espiral que presenta cuatro regiones diferentes. Una de ellas, muy conservada entre los distintos serotipos, permite su inserción en la pared bacteriana. Otra, localizada en el extremo N-terminal, es hipervariable y es la responsable de la especificidad de tipo. La proteína M es un importante factor de virulencia: inhibe la unión de los anticuerpos y protege a la bacteria de la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. Hay ciertos serotipos nefritogénicos (producen glomerulonefritis postestreptocócica), reumatogénicos (producen fiebre reumática postestreptocócica) e invasivos.

Proteína F

Se trata de una proteína que se une a la fibronectina celular. Esto favorece la *adherencia de S. pyogenes a las superficies epiteliales*.

Proteína inhibidora del complemento (SIC)

Es una proteína extracelular que inactiva la destrucción del microorganismo, por el complejo de ataque de membrana (C5-C9) generado por la ruta alternativa o la clásica del complemento.

Factor de opacidad sérica (SOF)

Su rol en la patogenia de las infecciones estreptocócicas es incierto.

Es una lipoproteínasa que degrada lipoproteínas séricas produciendo precipitados blanquecinos. Es utilizada en la tipificación de los estreptococos de los grupos A, C y G, porque es específica de tipo.

Estreptolisina O

Es una hemolisina lábil al oxígeno y es la responsable de la zona de beta-hemólisis que se observa alrededor de las colonias de *S. pyogenes* en placas de agar sangre.

Estreptolisina S

Es una hemolisina estable frente al oxígeno que se encuentra asociada a la pared celular y, por lo tanto, no difunde en el medio.

Otras enzimas

DNasas A, B, C y D, hialuronidasa, NADasa y estreptoquinasa, son otras enzimas que pueden explicar algunos fenómenos relacionados a la invasividad de estos gérmenes o a sus complicaciones no supurativas.

Exotoxinas

Las toxinas eritrogénicas A, B y C inducen la blastogénesis de los linfocitos, potencian el *shock* inducido por exotoxinas, generan fiebre, suprimen la síntesis de anticuerpos y actúan como superantígenos. El gen *speA* se transmite por conversión lisogénica, es decir, a través del genoma de un profago que lo incorpora y luego lisogeniza a otras bacterias. Los estreptococos productores de las toxinas A y B han sido asociados históricamente con casos graves de escarlatina y síndrome de *shock* tóxico.

Aunque todas las cepas son portadoras del gen *speB*, no todas son capaces de producir la correspondiente toxina. Además, la cantidad de toxina producida varía de cepa en cepa.

La toxina C también es mediada por bacteriófagos y su expresión es variable. Su presencia estuvo asociada a casos leves de escarlatina.

Se han reconocido otros superantígenos y un factor mitogénico. Sin embargo, su rol en las infecciones estreptocócicas todavía es incierto.

Patología asociada a los estreptococos beta hemolíticos

S. pyogenes* y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis

S. pyogenes tiene como hospedador natural al hombre. Los animales domésticos parecen contagiarse accidentalmente de éste. Una pauta importante que avala este concepto es que resulta difícil reproducir las enfermedades humanas en animales de experimentación. A veces, se requiere el uso de inóculos extremadamente elevados para poder hacerlo.

S. pyogenes es un reconocido agente productor de faringitis en el hombre. La faringitis o angina es la inflamación de la faringe que puede involucrar a las amígdalas y todo el tejido circundante. Se calcula que es el responsable de entre un 25 y un 35% de las mismas, produciéndose picos en otoño y primavera en la Provincia de Buenos Aires, a diferencia de otras zonas del país y de países del hemisferio norte en los que se observa un solo pico invernal. Esto contrasta con el impétigo (ver más adelante), que ocurre preponderantemente en verano.

La transmisión de la faringitis se efectúa de persona a persona (enfermo a persona susceptible o, menos frecuentemente, portador sano a persona susceptible) a través de las gotitas de saliva que se propagan por el aire en forma de aerosoles.

La faringitis puede tener una complicación tóxica llamada escarlatina (originada por la presencia de toxinas alfa especialmente). La escarlatina se caracteriza por un *rash* o eritema de color "escarlata", que deja la piel con un color de "langostino cocido" y una consistencia como de papel de lija. Esta erupción es más intensa en los pliegues de la piel y en la cara, está ausente alrededor de la boca (palidez circunoral). No hay erupciones en las palmas de las manos ni en las plantas de los pies. El exantema es seguido por una descamación, que es más evidente en las manos. La lengua se torna roja y con grandes papilas salientes (lengua de fresa). En la escarlatina, el microorganismo debe buscarse en las fauces a través de un hisopado. En la piel sólo ocurre un fenómeno generado por la toxina circulante.

El rol de los estreptococos de los grupos C y G (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) en la faringitis fue motivo de amplios debates. No obstante, hoy se considera que son agentes causales de alrededor de un 3 a un 5% de las faringitis bacterianas y se los encuentra especialmente en adultos. También se han detectado infecciones graves, complicaciones supurativas y casos de glomerulonefritis posestreptocócicas debidos a estos microorganismos.

Complicaciones supurativas

Se producen por contigüidad. La faringitis puede extenderse y afectar los senos paranasales (sinusitis), el oído medio (otitis media), las celdas mastoideas (mastoiditis), los ganglios linfáticos cervicales (linfadenitis cervical) o muy raramente los pulmones (neumonía). Eventualmente, puede

conducir a la formación de un absceso retrofaringeo o periamigdalino. Estas complicaciones, actualmente, son raras debido al pronto tratamiento antibiótico de las faringitis.

Complicaciones no supurativas

Las complicaciones no supurativas de la faringitis estreptocócica son la glomerulonefritis posestreptocócica y la fiebre reumática. Si bien la fiebre reumática es una complicación asociada exclusivamente a *S. pyogenes*, han documentado casos de glomerulonefritis fehacientemente provocados por estreptococos de los grupos C y G (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*). La glomerulonefritis puede originarse no solamente después de una faringitis, sino también *a posteriori* de episodios de impétigo, aunque los serotipos prevalentes son diferentes a los encontrados en casos de glomerulonefritis posteriores a la faringitis.

La fiebre reumática es una complicación no supurativa de las faringitis que se caracteriza por artritis, carditis (afectación de las válvulas cardíacas) y, eventualmente, manifestaciones del sistema nervioso central (corea). Hasta el momento se la ha asociado a faringitis por *S. pyogenes* pero no se descarta la posibilidad de que estreptococos de los grupos G y/o C puedan desencadenarla.

Complicaciones bacteriémicas

La diseminación por vía hematógena puede producir artritis supurada, endocarditis (rara), osteomielitis (rara), abscesos en general (raros), entre otros. Frecuentemente, están más asociadas a infecciones de piel y tejidos blandos que a las faringitis.

Infecciones de piel y tejidos blandos

S. pyogenes puede producir desde impétigo, erisipela y celulitis no complicada hasta fascitis necrotizante o miositis complicadas con síndrome de *shock* tóxico frecuentemente fatal.

***S. agalactiae* (grupo B)**

Perfil patogénico

S. agalactiae es un patógeno reconocido, principalmente asociado a sepsis neonatal con o sin meningitis. No obstante, también produce infecciones en adultos: infecciones relacionadas al parto o infecciones urinarias en mujeres embarazadas y también infecciones de piel y tejidos blandos (pié diabético), sepsis, neumonía e infecciones urinarias en adultos, especialmente ancianos

Serotipos

En su pared celular se destacan diversos carbohidratos y proteínas que han servido para clasificar serológicamente a estas bacterias. Hasta el momento se han descrito diez tipos capsulares: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX. Los serotipos VI, VII y VIII parecen ser frecuentes sólo en Japón y el

Sudeste asiático, mientras que el V ha sido encontrado cada vez con mayor frecuencia en los Estados Unidos y Europa. El serotipo III está fuertemente asociado a casos de meningitis.

Una proteína, la proteína c, ha permitido discriminar bacterias que las poseen de otras que no. Llamativamente, las cepas de serotipo III carecen de proteína c.

Streptococcus beta-hemolíticos del grupo S. anginosus.

Se trata de estreptococos que forman colonias muy pequeñas, del tamaño de la punta de un alfiler, con halos de hemólisis que superan en 4 o 5 veces el diámetro de dichas colonias. Son capaces de aglutinar con antisueros de los grupos C, G y más raramente A, aunque lo más frecuente es que aglutinen con sueros anti-F o que, directamente, no produzcan aglutinación con ninguno de los antisueros corrientemente utilizados en la rutina de los laboratorios clínicos (A, B, C, F y G). Los microorganismos de este grupo frecuentemente presentan hemólisis alfa o gamma (ver grupo *S. anginosus* dentro de los estreptococos del grupo viridans).

Sensibilidad a los antibióticos

Los estreptococos beta-hemolíticos, en general, son universalmente sensibles a penicilina excepto algunas cepas de *S. agalactiae* que mostraron tener una sensibilidad intermedia. Como antibióticos de segunda elección para casos de pacientes alérgicos a antibióticos beta-lactámicos, están los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina, etc.) y las lincosamidas (lincomicina, clindamicina). La clindamicina actualmente se utiliza como agente de elección para el tratamiento de infecciones graves con riesgo de producir *shock* tóxico debidas a *S. pyogenes* o *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, por ser un inhibidor de la síntesis de proteínas y por lo tanto, de toxinas.

Algunas cepas (en proporciones variables en los distintos países) pueden presentar resistencia a macrólidos con o sin resistencia acompañante a lincosamidas por mecanismos de eflujo activo, metilación del sitio de acción o por mutaciones en proteínas ribosomales o, directamente, en el ARN ribosomal.

Streptococos alfa- o gamma-hemolíticos

Para poder llegar a establecer el género, bastan unas pocas pruebas bioquímicas sencillas resumidas en el cuadro 3: bilis esculina, tolerancia a NaCl 6,5%, pirrolidonilarilamidasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP), observación de cadenas, tétradas o racimos en caldo tioglicolato, y determinación de su sensibilidad a vancomicina (cuadro 8, tabla 4)

Cuadro 8. Pruebas básicas para la identificación del género, especialmente en el caso de estreptococos alfa- o gamma-hemolíticos.

Bilis esculina

Hidrólisis de esculina en presencia de sales biliares.

Fundamento: En principio, los microorganismos que dan positiva esta prueba deben crecer en una concentración de 20 a 40% de bilis de buey, según las distintas formulaciones. En segundo lugar, deberán degradar la esculina para producir una coloración pardo-oscura a negra.

La esculina es un glucósido formado por la unión de glucosa con la esculetina (6,7-Dihidroxycumarina). El medio utilizado contiene iones férricos (citrato férrico amónico) que reaccionan con la esculetina y dan lugar a un complejo de color pardo oscuro a negro.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo se efectúa una estría en la superficie del medio preparado en tubos, en pico de flauta. Incubación al aire a 35°C. Lectura 18-24h.

Tolerancia a NaCl 6,5%.

Fundamento: Esta prueba determina la tolerancia a elevadas concentraciones salinas.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo, se inocula un tubo con caldo a esa concentración y un tubo control, con una concentración salina de 0 a 0,5%. Incubación al aire a 35°C.

Lectura: Se efectúa a las 18-24h.

Prueba positiva: Se observa turbiedad en ambos tubos.

Prueba negativa: Se observa turbiedad sólo en el tubo control.

Hidrólisis de la pirrolidonil-alfa-naftilamida (PYR)

Fundamento: Esta prueba permite observar la propiedad de las bacterias capaces de hidrolizar esta sustancia. Se efectúa de la siguiente manera:

L-pirrolidonil-alfa-naftilamida = L-pirrolidona (incolora) + alfa-naftilamina (incolora)

alfa-naftilamina + p-Dimetilaminocinamaldehído = Base de Schiff (roja)

Procedimiento: Con un inóculo muy denso de colonias aisladas del microorganismo, se estría un disco comercial previamente humedecido. Incubación al aire, a temperatura ambiente. A los 15 minutos se colocan dos gotas del reactivo revelador. Lectura 1-2 minutos.

Hidrólisis de la leucinaminopeptidasa (LAP)

El fundamento y el procedimiento de esta prueba son exactamente iguales a los del PYR.

Observación microscópica de la formación de cadenas de cocos en medio líquido

Fundamento: Existen bacterias similares a los estreptococos (*Pediococcus*, *Aerococcus*, entre otras) que en medio líquido se disponen en tétradas. De este modo, con esta prueba sencilla puede realizarse un primer tamizaje para poder llegar al reconocimiento del género.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo se inocula un tubo con caldo tioglicolato. Incubación al aire a 35°C. A las 18-24h o cuando se observe turbiedad, se efectúa una coloración de Gram con una gota del caldo.

Sensibilidad a altos niveles de vancomicina

Fundamento: Hay géneros relacionados a *Streptococcus* y *Enterococcus* (*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*) que presentan resistencia a altos niveles de vancomicina en forma natural. Si bien existen cepas de enterococos resistentes a vancomicina, esta resistencia es adquirida y, por lo tanto, no la poseen todos los microorganismos del género.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo se efectúan estrías sobre una placa de Agar Mueller Hinton + 5% de sangre ovina. Se deposita un disco de 30 µg de vancomicina. Lectura: a las 18 – 24 h se observa la presencia (S) o no (R), de un halo de inhibición.

Tabla 4. Identificación de cocos gram positivos catalasa negativos a nivel de género

Prueba	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	Otros
Bilis esculina	+	-/+	-/+
NaCl 6,5%	+	-	-/+
Cadenas	+	+	-/+
PYR	+	- *	-/+
LAP	+	+	-/+
Sensibilidad a vancomicina	S/R	S	S/R

* Sólo es positivo *S. pyogenes*

Streptococos del grupo viridans

Infecciones más frecuentes

Los estreptococos del grupo viridans pertenecen a la microbiota habitual de la mucosa orofaríngea y menos frecuentemente a la microbiota habitual intestinal o vaginal. Fueron inicialmente denominados así por presentar hemólisis de color verde (alfa). No obstante, hoy se sabe que dentro de este grupo y aún dentro de la misma especie, coexisten cepas alfa y gamma hemolíticas.

Ya en la primera mitad del siglo XX se sabía que se trataba de un grupo heterogéneo y no de una sola especie. Más tarde se advirtió que las entonces especies *S. mitis*, *S. bovis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. anginosus*, *S. mutans* eran, en realidad, grupos de especies (ver cuadro). Sin embargo la identificación a nivel de grupo tiene una importancia clínica innegable.

Las caries dentales y la endocarditis infecciosa son entidades reconocidas desde el siglo XIX como producidas frecuentemente por estreptococos del grupo viridans. A partir de 1980 se observó su participación en bacteriemias en pacientes neutropénicos, incluso generando cuadros de *shock* tóxico similares a los derivados de infecciones con *S. pyogenes*. Algunas especies pertenecientes al grupo *S. anginosus* tienen una tendencia marcada a originar colecciones purulentas, incluyendo abscesos en órganos sólidos (hígado, cerebro, pulmón).

Resumiendo, las principales entidades clínicas relacionadas con los estreptococos del grupo viridans son las que figuran a continuación:

- Caries dentales
- Endocarditis infecciosa
- Bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos
- Abscesos en órganos sólidos

Clasificación

Ruoff hizo una simplificación de la clasificación con fundamento clínico, uniendo los grupos mitis y sanguinis en mitis. Quedarían entonces los grupos mitis, anginosus, bovis, mutans y salivarius (Tabla 5).

Las pruebas de arginina dihidrolasa, manitol, sorbitol, Voges-Proskauer, esculina y ureasa permiten llegar a identificar alrededor de un 80% de las cepas a nivel de grupo. La incubación debe efectuarse hasta al menos 10 días, para dar por negativa alguna de ellas (Tabla 6).

Esta clasificación, basada en la clínica, se justifica por los siguientes motivos:

Los estreptococos del grupo mutans son los principales agentes productores de la placa bacteriana, origen de las caries dentales. Su presencia en materiales clínicos es rara, pero cuando se lo aísla de hemocultivos se debe pensar en una probable endocarditis.

Tabla 5. Grupos de especies dentro del grupo viridans

Grupos de especies	Especies incluidas ¹
Mutans	<i>S.mutans, S.sobrinus, S.ratti, S.cricetus</i> , <i>S.ferus</i> , <i>S.macacae, S.downei, S.hyovaginalis</i> .
Mitis	<i>S.mitis, S.oralis,, S.cristatus, S.infantis, S.peroris,</i> <i>S.orisratti</i> .
Sanguinis	<i>S.sanguinis, S.parasanguinis, S.gordonii</i> .
Salivarius.	<i>S.salivarius, S.vestibularis, S.infantarius (bovisII.1),</i> <i>S.alactolyticus, S.hyointestinalis, S.thermophilus</i>
Bovis	<i>S.equinus, S. gallolyticus subsp. gallolyticus (bovisI), S.</i> <i>gallolyticus subsp. pasteurianus (bovis II.2),</i> <i>S.lutetiensis</i> .
Anginosus	<i>S.anginosus, S.constellatus, S.intermedius</i>

¹ Las especies que no están en negrita aún no fueron descritas a partir de materiales humanos.

Su característica bioquímica principal es que son capaces de degradar varios azúcares.

Los estreptococos del grupo mitis son los más frecuentes en la práctica de la Microbiología clínica humana. Se localizan habitualmente en la mucosa oral y desde allí pasan al torrente sanguíneo por pequeños traumas, o alteración por quimioterápicos (en pacientes leucémicos, por ejemplo), y producen endocarditis bacteriana, frecuentemente, sobre válvulas nativas en pacientes normales (primer patógeno en frecuencia) y bacteriemias con o sin síndrome de shock tóxico en pacientes con neutropenia y fiebre.

Son bioquímicamente poco activos y, por ello, son difíciles de identificar con seguridad.

Los estreptococos del grupo *S. salivarius* son frecuentes contaminantes o productores de bacteriemias transitorias no significativas. Sin embargo, pueden estar involucrados en infecciones que tienen que ver con las vías biliares o incluso, como otros EGV, pueden estar implicados en casos de endocarditis y meningitis iatrogénica, aunque con menos frecuencia.

Los estreptococos del grupo bovis tienen como habitat el intestino humano y de los animales. Su presencia en sangre, generalmente, delata una endocarditis. Su identificación a nivel de grupo es trascendente, pues orienta a la presunción de patología colónica. Precisamente, obliga al médico a investigar la presencia de cáncer de colon. Dan positiva la prueba de bilis esculina y aglutinan en un 80% de los casos con antisueros para grupo D de Lancefield.

Los estreptococos del grupo anginosus son productores de abscesos y otras colecciones purulentas. Son muy frecuentes en abscesos cerebrales, hepáticos y pulmonares, solos o como parte de una flora polimicrobiana. Dan positiva la prueba de Voges Proskauer y sus colonias, pequeñas, despiden un típico olor a caramelo.

Abiotrophia y Granulicatella

En una época se los creyó mutantes de EGV, pero hoy se sabe que incluso pertenecen a géneros distintos: *Abiotrophia* y *Granulicatella*. Producen alrededor de un 3% de las endocarditis "estreptocócicas" de válvula nativa y, esporádicamente, otro tipo de infecciones, especialmente oculares. Su tratamiento es dificultoso y son responsables de fallas terapéuticas hasta en un 30% de los casos en endocarditis.

Son responsables, en parte, del fracaso en la recuperación de gérmenes en casos de endocarditis por la dificultad de los microbiólogos en ponerlos en evidencia. Tienen requerimiento de clorhidrato de piridoxal (vitamina B₆) y de clorhidrato de cisteína. Por ello, crecen en medio sólido ayudados por el desarrollo de otros microorganismos (estrías de estafilococos) dando lo que se llama "satelitismo" positivo. Esta prueba consiste en hacer desarrollar estas bacterias en agar sangre sin agregados adicionales de nutrientes, con la ayuda de un desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

No obstante, crecen bien en los medios líquidos utilizados en las botellas de hemocultivos comerciales. Incluso en ese contexto, se encuentran auxiliados por el aporte nutricional de la sangre del paciente. Por ello, se indica que obligatoriamente se realice la observación por coloración de Gram de una gota del caldo de hemocultivo previamente incubado al dar el pase a medio sólido.

Dan positiva la prueba del PYR.

Streptococcus pneumoniae (neumococo)

Se trata de microorganismos que, como los anteriores, coloniza las vías aéreas del ser humano, pero que en condiciones apropiadas es capaz de producir infecciones, que incluso pueden llevar a la muerte del paciente.

Los neumococos son los principales agentes de la neumonía aguda de la comunidad, tanto en niños como en adultos. Esta enfermedad, de altísima mortalidad en la era preantibiótica, aún produce cuadros graves con riesgo de vida en los extremos de la vida y en pacientes debilitados. Es uno de los tres principales productores de meningitis primaria en todas las edades, excepto en recién nacidos. Su morbilidad (capacidad de producción de secuelas) y mortalidad es superior a las de las meningitis por *Haemophilus* y por *Neisseria meningitidis*. Es agente productor de peritonitis espontánea primaria, especialmente en individuos con síndrome nefrótico. Más raramente produce artritis séptica e infecciones de piel y tejidos blandos. Es uno de los dos principales patógenos responsables de otitis media aguda y sinusitis aguda.

Este microorganismo es un coco gram positivo que se dispone en pares (diplococos) y cadenas. Frecuentemente es capsulado y su cápsula ha permitido la clasificación en más de 90 serotipos. Existe un suero polivalente, capaz de aglutinar con todos los serotipos de neumococo, que se utiliza unido a partículas de látex para el reconocimiento del antígeno neumocócico en líquidos biológicos.

Sus factores de virulencia principales son la cápsula (antifagocítica), la IgA proteasa y la C5a proteasa, que destruyen mecanismos de defensa del huésped, y la neumolisina, que es la hemolisina que le confiere su propiedad de producir alfa-hemólisis.

Desarrolla en presencia de sangre y hay cepas que requieren la presencia de 5% de CO₂. Sus colonias en agar sangre son chatas y con una depresión central producto del efecto de las autolisinas. Las autolisinas son enzimas que le sirven a la bacteria para degradar la pared bacteriana vieja para dar lugar a la nueva pared que se forma cuando se replica. El sistema autolítico del neumococo es muy sensible y es capaz de ponerse en marcha ante la presencia de diversos agentes o incluso por envejecimiento de las bacterias. Por ello la depresión se observa en el centro de las colonias. Las pruebas bioquímicas destinadas a su identificación (básicamente, diferenciación de los estreptococos del grupo viridans y algunas otras bacterias relacionadas) son la sensibilidad a optoquina (etilhidrocupreína) y la solubilidad en bilis y en ambas se aprovecha la capacidad autolítica de estas bacterias (cuadro 9, tabla 7)

Cuadro 9. Pruebas bioquímicas destinada a la identificación de *Streptococcus pneumoniae*.

Prueba de la optoquina

Fundamento: El neumococo es inhibido por la optoquina y produce halos mayores o iguales a 14 mm, con discos de 6 mm de esta sustancia.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo, se efectúa una suspensión (turbiedad # 0,5 de la escala de Mac Farland) en un tubo de solución fisiológica o caldo. Se estría una placa de agar Mueller Hinton + 5% de sangre ovina y se coloca un disco de optoquina como para hacer un antibiograma. Incubación en atmósfera con 5% de CO₂ a 35°C. Lectura 18-24h.

Solubilidad en bilis (sales biliares)

Fundamento: En presencia de sales biliares y pH neutro, el neumococo activa sus autolisinas de tal manera que una suspensión turbia puede tornarse transparente.

Procedimiento: Con colonias aisladas del microorganismo, se efectúa una suspensión (turbiedad # 4 de la escala de Mac Farland) en un tubo con 2 ml de solución fisiológica. Se transfiere 1 ml a otro tubo seco. Al primero se le agrega 1 ml de solución de desoxicolato de sodio al 10%. Al segundo se le agrega 1 ml de solución fisiológica. Incubación en atmósfera normal a 35°C. Lectura: observar cada 15 minutos hasta las 2h. Tubo 1, transparente, y tubo 2, turbio: prueba positiva. Tubos 1 y 2, turbios: prueba negativa.

Tabla 6. Identificación a nivel de grupos de especies de estreptococos del grupo viridans y *S. pneumoniae* (neumococo)

Grupo de especies	Opto	Bilis	Arg	Mnl	Sbl	E	VP	U
Neumococo	S	S						
<i>Mitis</i>	R	R	+/-	-	-/+	+/-	-	-
<i>Mutans</i>	R	R	-	+	+/-	-/+	+	-
<i>Bovis</i>	R	R	-	+/-	-	+	+	-
<i>Salivarius</i>	R	R	-	-	-	+/-	+/-	+
<i>Anginosus</i>	R	R	+	-	-	+/-	+	-

Opto: sensibilidad a la optoquina. Bilis: solubilidad en bilis. Arg: arginina dihidrolasa. Mnl y Sbl: fermentación de manitol y sorbitol. E: esculina. VP: Voges Proskauer. U: ureasa.

***Enterococcus* spp.**

Los enterococos fueron diferenciados en 1899 de otros cocos que se disponían en cadenas por su bajo poder patógeno y su localización entérica. Esta última tendencia le valió su denominación de “enterococos”. Son cocos gram positivos, catalasa negativos, que se disponen en pares y cadenas y toleran condiciones ambientales extremas. Desarrollan a 10° C y 45° C, resisten el calentamiento a 60° C, durante 30 minutos, crecen en caldo con 6,5% de CINA y en presencia de concentraciones elevadas de sales biliares. Lancefield los había clasificado, en la década del 30, dentro del grupo D, por las características antigénicas de su pared celular. Este antígeno no es el polisacárido C de la pared celular como en los otros casos, sino que se trata de ácido teicoico. El antígeno D también está presente en la pared de los estreptococos de los EGV del grupo bovis. Actualmente, se reconocen 21 especies dentro del género *Enterococcus* (Cuadro 10); las más comunes son *E. faecalis* (85-90% de los enterococos aislados de infecciones humanas) y *E. faecium* (8-11%).

Su resistencia a diversos agentes físicos y químicos ambientales les permite sobrevivir en el suelo, en alimentos y en agua. Son parte de la microbiota habitual del hombre y de los animales. Su principal hábitat es el tracto gastrointestinal, pero también se los puede encontrar colonizando la mucosa orofaríngea, la mucosa vaginal y la piel, sobre todo en la zona perianal. Transitoriamente pueden colonizar el estómago de pacientes intubados, lo que explicaría algunos casos de neumonía intrahospitalaria.

En centros donde se atienden pacientes pediátricos portadores de uropatías graves, se ha documentado hasta un 10% de aislamientos de enterococos en muestras de urocultivo. Si bien en muchos casos los enterococos producen infecciones de origen endógeno, recientemente fueron señalados entre los cinco patógenos más frecuentes en infecciones hospitalarias. Además, ha sido demostrada su diseminación horizontal dentro de las salas de hospitales.

En Pediatría son especialmente importantes las bacteriemias en neonatos de bajo peso y otros pacientes hospitalizados. Los factores de riesgo más importantes son:

- Administración previa de antibióticos.
- Ruptura de la barrera mucosa gastrointestinal.
- Hospitalización prolongada.
- Inmunodepresión.

Los enterococos se asocian, en algunas oportunidades, a enfermedades invasivas en neonatos o lactantes de menos de 8 semanas de vida, aunque este tipo de infecciones puede presentarse también en niños mayores. A menudo aparecen como responsables de infecciones urinarias, especialmente en pacientes con patología urológica de base y con mucha menos frecuencia producen infecciones respiratorias, endocarditis y meningitis. En infecciones intraabdominales suelen estar asociados a otros agentes bacterianos como parte de la microbiota polimicrobiana. En estos casos, su presencia merece ser jerarquizada cuando se los aísla de abscesos intraabdominales o de hemocultivos, cuando el paciente estuvo recibiendo drogas inactivas frente a los enterococos o cuando padece algún tipo de inmunodepresión.

Los enterococos son microorganismos poco exigentes que desarrollan en la mayoría de los medios comúnmente empleados en la siembra de materiales clínicos. Sin embargo, su participación frecuente en infecciones mixtas a veces obliga a la utilización de medios selectivos (por ejemplo: agar con colistín y ácido nalidíxico) o agar cromogénico. De este modo, se pueden visualizar sus colonias aunque coexistan con microorganismos de crecimiento muy rápido como *Escherichia coli* o *Proteus mirabilis*. En agar sangre humana hay cepas que pueden presentar β-hemólisis. Sin embargo, no lo hacen si se utiliza sangre ovina.

Cuando en estos medios se aíslan cocos gram positivos, catalasa negativos, deben realizarse las siguientes pruebas, para la orientación a nivel de género: bilis esculina, tolerancia a CINa al 6,5%; sensibilidad a vancomicina; PYR (pirrolidonilarilamidasa); LAP (leucinaminopeptidasa); observación de la formación de cadenas en caldo de tioglicolato, crecimiento a 45° C y 10° C. Si todas ellas fueran positivas, se trata de un aislamiento de *Enterococcus* sp. y se procede a la identificación a nivel de especie. Para ello, se puede emplear un esquema reducido, que rápidamente define las especies más frecuentes (Tabla 7).

Cuadro 10. Especies de enterococos, actualmente reconocidas

Especies aisladas de materiales clínicos humanos	Especies aisladas de otras fuentes
<i>E. avium</i>	<i>E. saccharolyticus</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. dispar</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. sulfureus</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. columbae</i>

<i>E. malodoratus</i>	<i>E. porcinus</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. ratti</i>
<i>E. pallens</i>	<i>E. asini</i>
<i>E. gallinarum</i>	
<i>E. pseudoavium</i>	
<i>E. mundtii</i>	
<i>E. raffinosus</i>	
<i>E. cecorum</i>	
<i>E. durans</i>	
<i>E. hirae</i>	

Tabla 7. Enterococos: Identificación a nivel de especie

Pruebas bioquímicas	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Especies móviles	Otros
Arginina	+	+	+/-	+/-
Manitol	+	+	+	+/-
Arabinosa	-	+	+	+/-
Telurito	+	-	-	-
Movilidad	-	-	+	-
Alfa-metilglucósido	-	-	+	+/-
Pigmento	-	-	+/-	+/-

Otras pruebas: Sacarosa, rafinosa, sorbitol, sorbosa, piruvato, xilosa, hipurato

Si fuera necesario, se puede utilizar una batería de 12 pruebas. Los métodos miniaturizados (por ejemplo: API-Strept, Bio Mérieux) o automatizados (MicroScan, Vitek) aún no han sido adaptados para identificar con seguridad a las nuevas especies.

La resistencia natural a varios antibióticos ha representado siempre un problema para el enfoque terapéutico de infecciones enterocócicas graves. Ella se manifiesta como una resistencia a bajos niveles de beta-lactámicos (CIM de penicilina = 2-30 mg/L), aminoglucósidos (CIM = 4-128 mg/L) y lincosamidas.

Además, presentan resistencia a trimetoprima y sulfamidas en presencia de folatos y, como otros gram positivos, resistencia a altos niveles de polimixinas. A estas resistencias naturales, se les fueron sumando mecanismos adicionales de resistencia (resistencia adquirida) que, en algunos casos, anulan todas las alternativas terapéuticas, sobre todo cuando están involucrados en endocarditis infecciosa. Algunos ejemplos son la resistencia a penicilina o ampicilina, a altos niveles de aminoglucósidos, a vancomicina, etc.

Bibliografía específica

Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Gram-positive pathogens. 2nd ed, ASM Press, Washington D.C, EEUU, 2006.

Stevens D.L., Kaplan E.L. Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis. Oxford University Press, Nueva York, EEUU, 2000.

De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta C, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J.Clin.Microbiol. 41: 1219-1224, 2003).

Schuchat A. 1999. Group B streptococcus. Lancet 353: 51-56.

Johnson DR y col. Laboratory Diagnosis of group A streptococcal infections. WHO, Geneva, 1996.

PARTE III

Microorganismos productores de patología en el hombre

CAPÍTULO 2

Bacilos gram negativos

Dentro de los bacilos gram negativos anaerobios facultativos fermentadores de glucosa, están comprendidas las familias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* y otros microorganismos que presentan requerimientos nutricionales específicos que las caracterizan como "de crecimiento dificultoso". Desde el punto de vista práctico, es conveniente diferenciarlos también de otros bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa aeróbicos estrictos.

2a. Enterobacterias

Debido al gran número y diversidad de microorganismos que pertenecen a esta familia, vamos a dividirlos en dos grupos: uno al que pertenecen aquellos microorganismos que producen patología gastrointestinal, que veremos en detalle en el capítulo correspondiente (Parte IV, capítulo 10, cuadro N°1), y otro en el que se incluyen aquellas bacterias que producen infecciones en otros sitios (cuadro N°2). Existe un tercer grupo de bacterias raramente asociadas a infecciones humanas que directamente no serán tomadas en cuenta para los fines de este tratado. Para ello sugerimos consultar el Manual de Microbiología Clínica de la American Society for Microbiology (Versalovic J. et al. 2011).

Cuadro N°1. Enterobacterias que producen infecciones gastrointestinales.

<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrágica, enteroadherente, enteropatógena, enteroinvasiva, etc.)	<i>Shigella boydii</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella sonnei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>

En negrita se indican las bacterias más frecuentes en esta patología

Cuadro N°2. Enterobacterias que producen otro tipo de infecciones

<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia spp</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Citrobacter spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Serratia spp</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia spp</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Enterobacter spp</i>	<i>Proteus penneri</i>	

En negrita se indican las bacterias más frecuentes en esta patología.

Características de la familia *Enterobacteriaceae*

Los miembros de esta familia son bacilos gram negativos, de longitud variable. Son móviles por flagelos peritricos (p. ej.: *Proteus mirabilis*) o no móviles (p. ej: *Klebsiella*, *Shigella*). No son exigentes en sus requerimientos nutricionales y desarrollan en medios con extracto de carne o peptona, sin necesidad de la adición de NaCl u otros suplementos y crecen bien en agar Mac Conkey. Son aerobios y anaerobios facultativos por lo que crecen bien en aero y anaerobiosis.

Fermentan y oxidan D-glucosa, a menudo con producción de gas. Son catalasa positivos y **oxidasa negativos**. **Reducen los nitratos a nitritos** y tienen entre 39 y 59% de contenido de G+C en su ADN. Hay una única especie oxidasa positiva, *Plesiomonas shigelloides*, que es un agente etiológico infrecuente de diarrea y que habitualmente se la incluye dentro del grupo *Vibrio-Aeromonas*, a los efectos prácticos de su identificación desde el punto de vista clínico.

Hábitat Natural

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en plantas y suelo, agua e intestino de humanos y animales.

Algunas especies ocupan un nicho ecológico muy limitado: por ejemplo, *Salmonella enterica* serovar Typhi se encuentra en aguas y causa fiebre tifoidea sólo en humanos. En contraste, cepas de *Klebsiella pneumoniae* están distribuidas ampliamente en el ambiente y contribuyen en procesos bioquímicos y geoquímicos. Además, son también causa de enfermedades humanas de distinto tipo. Se las puede observar colonizando asintóticamente el intestino, pero también produciendo infecciones urinarias, del tracto respiratorio, septicemia, etc.

Infecciones humanas

Las bacterias de esta familia están asociadas con abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones de heridas, del tracto urinario y del intestino. Son componentes importantes de la microbiota intestinal normal pero son relativamente poco comunes como comensales en otros sitios del organismo, a excepción del caso de pacientes internados. Es así que algunas especies son causa frecuente de infecciones nosocomiales.

De los aislamientos significativos en clínica, las enterobacterias significan el 80% de los bacilos gram negativos aislados en el Laboratorio de Microbiología y el 50 % de todos los aislamientos clínicamente significativos. Son causa del 50 % de casos de septicemia, más del 70 % de infecciones del tracto urinario y, aproximadamente, constituyen un 66 % de cepas aisladas a partir de materia fecal de pacientes con gastroenteritis.

Muchas de estas infecciones, como por ejemplo las sepsis, son una amenaza para la vida y son a menudo adquiridas en hospitales. A causa de la gravedad de estas infecciones, el aislamiento rápido, la identificación oportuna y los ensayos de sensibilidad frente a antimicrobianos, son esenciales para ayudar al médico en la elección de un tratamiento adecuado.

Aislamiento

La mayoría de las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* crecen rápidamente en los medios usados comúnmente en el laboratorio de Microbiología Clínica. Crecen bien en agar nutritivo, agar tripteína de soja, agar Mueller Hinton, agar sangre y, por supuesto, en agar chocolate. Existen medios semiselectivos y diferenciales para la recuperación de enterobacterias, como el agar MacConkey, el agar EMB y el agar SS o solamente diferenciales como el CLDE (ver composición en el apéndice II) que ayudan también a la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otros bacilos gram negativos. En este sentido, son muy útiles los medios cromogénicos.

Se pueden usar caldos de enriquecimiento, específicos para algunas de ellas que se encuentren en baja concentración (por ejemplo, caldo selenito para *Salmonella*).

Identificación

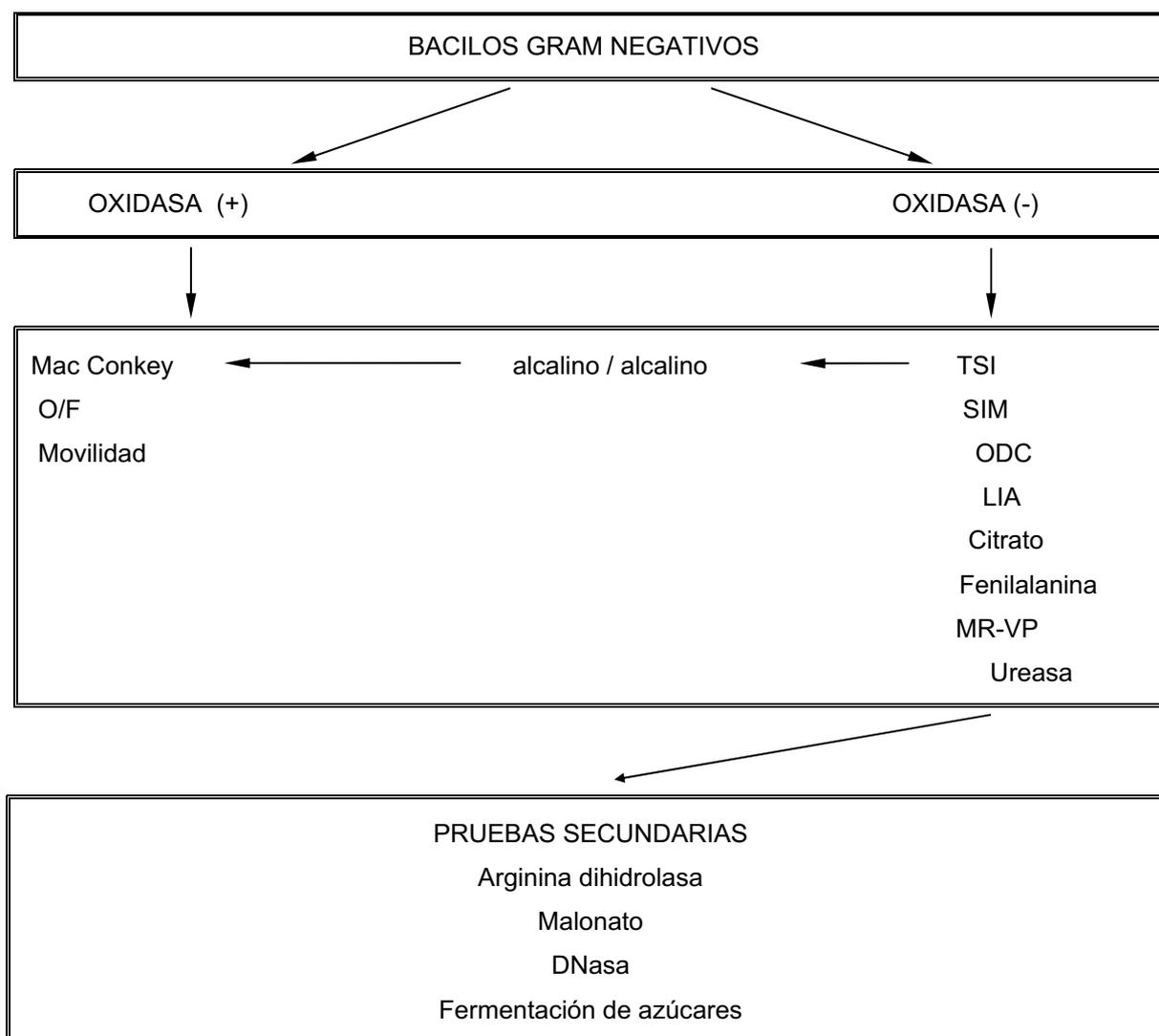
Luego de aislar las bacterias en los medios ya descritos, se deben identificar a nivel de género y especie y, para eso, como primer paso se realiza la prueba de oxidasa (ver cuadro N°3 del capítulo 1). Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* dan negativa la prueba de oxidasa (a excepción de *Plesiomonas*, que recientemente fue incorporada a esta familia).

A continuación se efectúan pruebas bioquímicas (ver fundamentos y resultados en páginas posteriores). Cada una de estas pruebas permite la observación de una o más propiedades de la bacteria.

Todo ello conduce a una identificación final de género y especie. La identificación definitiva puede requerir de métodos más sofisticados (pruebas miniaturizadas, serología, métodos moleculares).

Se incuban a 35° C, por 18 - 24h, y con los resultados de las pruebas se pueden consultar las tablas del Manual de la American Society for Microbiology (Versalovic J. et al. 2011). Se completan luego las pruebas para confirmar.

Cuadro N° 3. Esquema inicial para la identificación de los bacilos gram negativos de crecimiento rápido.



2b. Bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa (BNF)

Características generales

La clasificación general de estas bacterias puede verse en el cuadro 4. Todas son bacterias gram negativas, generalmente su forma es bacilar, pero su morfología celular es variable. Por ejemplo, las

cepas de *Pseudomonas* se presentan como bacilos rectos o ligeramente curvos, en tanto que las de *Acinetobacter* se ven al microscopio como bacilos gruesos, generalmente muy cortos, cercanos a la forma cocoide. No fermentan la glucosa. Pueden dar positiva o negativa la prueba de oxidasa. Algunos son móviles y otros no. Algunos poseen pigmentos y otros no. No son esporulados y dan negativa la prueba de Voges-Proskauer.

Crece bien a temperatura ambiente (18 - 22°C) o a 30°C. En su gran mayoría lo hacen en los medios comunes de aislamiento. Muy pocos necesitan medios suplementados para poder desarrollar. Dentro de este grupo de bacterias encontramos una gran variedad de géneros y especies, pero consideraremos las más importantes en clínica hasta el momento.

Habitat natural e infecciones humanas

Los BNF representan el 15 % de las bacterias aisladas en el laboratorio de Microbiología Clínica.

El 66% de ellos pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, 16% a otras especies de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, 9% a especies de *Acinetobacter* y 4% a especies de *Chryseobacterium* o *Elizabethkingia*.

Cuadro 4. Clasificación de BNF

Móviles con flagelos polares	
Familia <i>Pseudomonadaceae</i>	
Ia grupo fluorescente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>* <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Ib grupo stutzeri	<i>Pseudomonas stutzeri</i> y otras
Ic grupo alcaligenes	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> y otras
II grupo pseudomallei	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> y otras*
Misceláneas	<i>Shewanella putrefaciens</i> y otras
Familia <i>Comamonadaceae</i>	
III	<i>Comamonas acidovorans</i>
IV grupo diminuta	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>

Móviles, oxidasa negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>*
Móviles con flagelos peritricos	
Familia <i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes</i>
Familia <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>
Posición taxonómica incierta	<i>Achromobacter</i> y otras.
No móviles, oxidasa positivos	
Familia <i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i> <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> <i>Flavimonas</i> y otros
No móviles, oxidasa negativos	<i>Acinetobacter</i>*

Resaltadas en negrita las especies de importancia en clínica humana. *Con asterisco se destacan las más frecuentes

Son microorganismos oportunistas ambientales, ya que se encuentran en el suelo y en el agua, y colonizan distintas áreas del cuerpo humano. Por diferentes motivos (manipuleos quirúrgicos, administración de antibióticos o enfermedades que disminuyen las defensas), pueden producir desde infecciones leves a otras muy graves, sobre todo en pacientes hospitalizados.

Algunos como *Pseudomonas aeruginosa*, son patógenos nosocomiales importantes. Como agravante, estos microorganismos presentan una marcada resistencia a los antibióticos. Para poder encontrar la fuente de diseminación (reservorio) de estas bacterias, se las debe buscar en lugares húmedos del ambiente hospitalario: soluciones antisépticas, detergentes, nebulizadores, respiradores, aparatos de aire acondicionado, entre otros. Pueden sobrevivir mucho tiempo en agua destilada en *freezers* de -20°C y también en condiciones adversas de temperatura, pero no resisten la sequedad.

Móviles con flagelos polares

Familia Pseudomonadaceae

I. Grupo fluorescente

- a) género *Pseudomonas*: son bacterias ampliamente distribuidas en suelo, agua, plantas y animales. Tienen predilección por sitios húmedos del medio ambiente y del hombre: axilas, oídos, perineo.

Pseudomonas aeruginosa es la especie que con mayor frecuencia produce infecciones en el hombre. Es el principal patógeno en quemados, en quienes pueden llegar a producir sepsis. También infecta heridas, vías urinarias y el tracto respiratorio inferior. Como patógeno primario afecta el tracto respiratorio inferior de pacientes con enfermedad fibroquística de páncreas. Produce también la llamada otitis maligna crónica en diabéticos. Puede producir sepsis en pacientes hospitalizados, generalmente en aquéllos asistidos mecánicamente, ya que se encuentra en lugares húmedos (nebulizadores, respiradores, soluciones de limpieza, algunos desinfectantes, soluciones viejas o diluidas, tanques de agua potable, mezcladores de alimentos, canillas, piletas, etc.). Fuera del hospital se encuentra en piletas de hidromasajes, piletas de natación, bañeras, contaminando soluciones de lentes de contacto, entre otros. Rara vez causan enfermedad en personas sanas, si bien es un saprófito humano común. En ellas pueden causar infecciones osteoarticulares a partir de heridas punzantes.

Pseudomonas fluorescens y *Pseudomonas putida*: estos microorganismos pueden también ocasionar infecciones humanas, aunque menos frecuentemente. Se las puede aislar de secreciones de vías respiratorias, orina, heridas, líquido articular y hemocultivos. Son posibles agentes contaminantes de sangre de banco por ser bacterias psicrófilas (sobre todo *P. fluorescens*).

II grupo pseudomallei

Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei: Es agente causal de la melioidosis en el hombre, que es una neumonía aguda generalmente seguida de una sepsis grave. La melioidosis es una enfermedad propia del Sudeste de Asia pero podría diseminarse como consecuencia de la fluidez de las comunicaciones.

Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: Es un patógeno hospitalario y se ha recuperado de materiales clínicos como hemocultivos en drogadictos y en esputos de pacientes con fibrosis quística de páncreas, en estadios terminales de la enfermedad. Se ha aislado de desinfectantes diluidos en uso y de agua hospitalaria, por lo que se le atribuye la capacidad de producir brotes de infecciones nosocomiales.

Familia Comamonadaceae

Stenotrophomonas maltophilia: Es un microorganismo de vida libre. Se puede encontrar en leche cruda, pasteurizada, agua de pozo, agua destilada, agua estancada, conducto auditivo externo, piel de buceadores, entre otros. Estas bacterias son menos frecuentes que *P. aeruginosa* en aislamientos de muestras clínicas, pero se aíslan con mayor asiduidad que otras pseudomonadales.

Se encuentran produciendo el mismo tipo de infecciones que *P. aeruginosa* y la más común es la infección urinaria. Presentan resistencia natural a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes. Trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) es el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia*. Las pruebas de sensibilidad por difusión con discos

han sido estandarizadas por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute de los EE.UU.) sólo para algunos antibióticos (ticarcilina-ácido clavulánico, TMS, ceftacidima, minociclina, levofloxacin y cloranfenicol).

No móviles, oxidasa positivos

Familia Flavobacteriaceae

Se reconocen varias especies. Se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza: agua, suelo, zonas húmedas. En hospitales se han aislado de bebederos, canillas, baños de agua, acondicionadores de aire, etc.

Elizabethkingia meningoseptica (*Chryseobacterium* o previamente *Flavobacterium meningosepticum*): Puede ser causa de brotes de meningitis neonatal. Rara vez es patógeno en adultos. Produce casos esporádicos de bacteriemias, endocarditis bacteriana subaguda, neumonía y meningitis. Es poco frecuente en infecciones humanas y es muy resistente a los antibióticos. Al menos *in vitro* es sensible a vancomicina, un antibiótico inactivo frente a otros bacilos gram negativos. No están estandarizadas las pruebas de sensibilidad por difusión.

No móviles, oxidasa negativos

Género *Acinetobacter*: Son bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza; se las aísla de suelo, aguas servidas, entre otros. Las cepas de *Acinetobacter* aparecen como parte de la microbiota normal de piel, tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario de pacientes hospitalizados.

Acinetobacter ha sido causa de epidemias y pseudoepidemias hospitalarias. En estas últimas, los microorganismos no están infectando al paciente sino que aparecen en los hemocultivos como contaminantes de las muestras.

La infección más frecuente en el hombre es la neumonía o la traqueobronquitis aunque se la ve involucrada también en infecciones urinarias, infecciones de heridas, sepsis, entre otros. La mayoría de los pacientes infectados son de edad mediana o mayores, internados en terapia intensiva, con asistencia mecánica y que poseen colocado algún catéter o sonda. En estos últimos, produce infección urinaria. Se distinguen dos grupos: *Acinetobacter baumannii* / *calcoaceticus* y *Acinetobacter Iwoffii* / *junii*. El primero oxida la glucosa en medio O/F y frecuentemente es multirresistente. El segundo no oxida la glucosa, puede no desarrollar en agar MacConkey y suele ser muy sensible a los antibióticos con excepción de las cefalosporinas de primera generación.

Género *Moraxella* (actualmente se lo considera con posición incierta dentro de esta clasificación). Estas bacterias pertenecen a la microbiota habitual de las mucosas del hombre y de algunos animales. Han sido aisladas como agentes etiológicos de infecciones intrahospitalarias, infecciones

de heridas, neumonías, entre otras. Son cocobacilos gram negativos a excepción de *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* que se presenta en forma de diplococos gram negativos. Por esto, sus características bioquímicas serán estudiadas junto a las correspondientes a microorganismos del género *Neisseria*.

Moraxella lacunata: Se aísla principalmente de infecciones oculares.

Eikenella corrodens: Es un miembro del grupo ACEK y será estudiada en ese capítulo. Aquí se la incluye pues puede confundirse con algunos microorganismos pertenecientes a este grupo en la clasificación inicial. Se diferencia en que es de crecimiento dificultoso (no desarrolla en MacConkey).

Aislamiento de los bacilos gram-negativos no fermentadores.

Los medios primarios de aislamiento dependen del origen de la muestra. Crecen bien en medios enriquecidos, como agar sangre, y algunos BNF pueden aislarse en medios poco selectivos y diferenciales como EMB, CLDE o agar MacConkey (ver composición y resultados en el Apéndice II). La temperatura óptima de incubación es la temperatura ambiente (18-22°C). Hay algunas especies que desarrollan mejor a 30°C. La mayoría de ellas crecen bien a 35-37°C.

Las diferentes especies presentan distintos tipos de colonias en los diferentes medios. Incluso *P. aeruginosa* puede dar colonias de distinto tipo: unas son de bordes irregulares, hemolíticas en agar sangre, de olor característico, pigmentadas o no, otras son mucosas, otras, llamadas enanas, de diámetro muy pequeño (1 mm) y otras similares a las de las enterobacterias. Otras especies dan colonias muy diferentes. Las colonias del género *Acinetobacter* en agar sangre son de color blanco grisáceo, de dos a tres milímetros de diámetro, y las colonias de *Pseudomonas stutzeri*, son secas y rugosas.

El color verde típico de *P. aeruginosa* (Fig. 1), dado por la mezcla de pirocianina y fluoresceína, puede estar ausente o puede estar enmascarado por la producción de otro pigmento rojo (piorrubina). En este caso, las colonias son marrones. Cuando los pigmentos están presentes (colonias verdes) y presentan el olor frutal característico, el microbiólogo puede considerar que se trata de *Pseudomonas aeruginosa*, sin realizar ninguna prueba bioquímica.

Identificación

Luego de aislar estas bacterias en los medios mencionados, se realiza la coloración de Gram y se hacen las siembras en distintos medios y pruebas bioquímicas, para determinar a qué género y especie pertenecen. (Tablas 1, 2 y 3 y Apéndice III)



Figura 1. Antibiograma por difusión de dos cepas pigmentadas de *P. aeruginosa*. Nótese el pigmento verde azulado desarrollado en la placa de agar Mueller Hinton de la derecha (exceso relativo de piocianina) y el pigmento verde amarillento de la izquierda (exceso relativo de fluoresceína o pioverdina).

Tabla 1. Pruebas iniciales para la identificación de BNF

Microorganismos	Cat	Ox	O/F glucosa	Mac C	Mov (caldo)	Cet
<i>P. aeruginosa</i> y grupo fluorescente	+	+	oxida	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> grupo <i>Iwoffii/junii</i>	+	-	inactivo	+ / -	-	-
<i>A. grupo baumannii Calcoaceticus</i>	+	-	oxida	+	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	oxida	+	+	-
Grupo <i>pseudomallei</i>	+	+ / -	oxida	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> grupo <i>stutzeri</i>	+	+	oxida	+	+	-
Flavobacteriaceae	+	+	oxida	+	-	-
<i>Alcaligenes, Bordetella</i> y otras	+	+	Inactivo / oxida	+	+	-
<i>Sphingobacterium</i>	+	+	inactivo / oxida	-	-	-
<i>Moraxella/ Oligella</i>	+	+	inactivo	- / +	-	-
<i>Pseudomonadales</i> alcalinas	+	+	alcaliniza	+	+	-
<i>Pseudomonadales</i> con pigmento amarillo	+	v	oxida	v	+	-
<i>Methylobacterium/ Roseomonas</i>	+	+	inactivo / oxida	v	+ / -	-
<i>Ochrobactrum/ Agrobacterium/ Achromobacter, etc.</i>	+	+	oxida		+ / -	-

Cat: catalasa ; Ox: oxidasa ; O/F: medio de oxidación/fermentación de Hugh y Leifson; MacC: desarrollo en agar MacConkey; Mov: movilidad a temperatura ambiente; Cet: desarrollo en agar cetrimida

Tabla 2. *Pseudomonas* spp. grupo fluorescente

Prueba	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Piocianina	+	-	-
Pioverdina	+	+	+
Nitratos	V (74%)	V (19%)	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-
Gelatina	V (46%)	+	-
Kanamicina	R	S	S
Carbenicilina	S	R	R

V: variable, R: resistente, S: sensible

Tabla 3. Grupo pseudomallei

Prueba	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Burkholderia</i> grupo <i>cepacia</i>
Oxidasa	+	+ (93%)
O/F glucosa	oxida	oxida
Arginina	+	-
Lisina	-	+
Urea	V (43%)	V (45%)
Polimixina B	R	R

V: variable R: resistente

2c. Grupo ACEK (ex HACEK), *Haemophilus* spp. y otros bacilos gram negativos de crecimiento dificultoso

Tradicionalmente comprendidos bajo el acrónimo HACEK, estaban los bacilos gram negativos de desarrollo dificultoso, habitantes normales de la mucosa orofaríngea del hombre y con tendencia a producir endocarditis infecciosa, aunque sólo se aíslan en aproximadamente un 2% de los casos. Estas bacterias fueron reclasificadas, por lo que actualmente el acrónimo se debiera escribir sin la H de *Haemophilus*, dado que la única especie de ese género perteneciente al grupo, *Haemophilus aphrophilus*, pasó a integrar el género *Aggregatibacter*, al igual que el previamente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. De este modo, el acrónimo queda como ACEK y el grupo está constituido por bacterias de los géneros *Aggregatibacter*,

Cardiobacterium, *Eikenella* y *Kingella*. Por sus características de microorganismos exigentes, podemos incluir también a las bacterias del género *Capnocytophaga*.

Grupo ACEK

- Son parte de la microbiota habitual de la orofaringe.
- Todas fermentan glucosa (hay que agregar suero a los medios).
- Son capnófilas.
- No desarrollan en Mac Conkey.
- Son agentes etiológicos de endocarditis infecciosa.

Independientemente de la clasificación taxonómica actual, desde el punto de vista práctico, resulta de interés esta agrupación porque con una sola prueba (requerimiento de factor V) podemos separarlos de las especies de *Haemophilus*. Sólo unas pocas cepas de *A. aphrophilus* podrían tener requerimiento de factor V (NAD). Ver más adelante en *Haemophilus*.

En la coloración de Gram, se los suele ver como cocobacilos gram negativos (*Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Kingella*), similares a las especies de *Haemophilus* (Fig. 2). Las bacterias del género *Cardiobacterium* son pleomorfas en agar sangre, se tiñen de forma irregular y se disponen en pares, cadenas cortas, o en una típica forma de roseta.

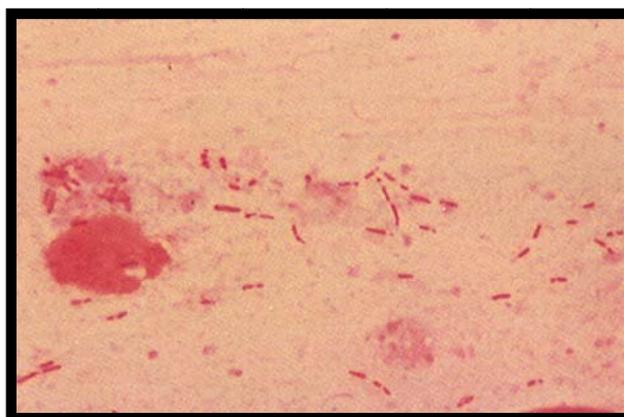


Figura 2. Cocobacilos gram negativos con formas compatibles con *Haemophilus* spp. o microorganismos del grupo ACEK.

Cardiobacterium spp., *E. corrodens*, *A. aphrophilus* y *Kingella* spp. desarrollan en agar sangre y requieren una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ o crecen mejor en esas condiciones. En el caso de *Kingella kingae*, su aislamiento a partir de líquidos biológicos o pus puede resultar dificultoso por la presencia de sustancias inhibitoras en los mismos. De allí que se apele a inocular frascos para hemocultivo o a realizar técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para ponerla en evidencia.

Aggregatibacter

Las colonias de *A. actinomycescomitans*, con el tiempo (3 a 5 días), presentan una forma estrellada característica, que se puede ver al microscopio con 100X. *A. aphrophilus*, por el contrario, forma colonias circulares, de borde regular y más opacas en el centro. Ambas son agentes de endocarditis, pero *A. aphrophilus* ha sido aislada de infecciones osteoarticulares y abscesos cerebrales.

Cardiobacterium

Son bacterias muy raramente aisladas de materiales clínicos. Producen principalmente endocarditis. Como se dijo, su morfología en la coloración de Gram es característica. La especie más frecuente es *Cardiobacterium hominis*.

Eikenella corrodens

Es la única especie de este género. Se asocia con infecciones de cabeza y cuello, endocarditis, neumonías aspirativas, osteoarticulares, abscesos cerebrales, infecciones de heridas posteriores a mordeduras humanas, etc. En el examen directo se ve como bacilos gram negativos delgados, cortos, de bordes redondeados. Forma colonias de 1 a 2 mm de diámetro a las 48h que, generalmente, perforan el agar (*pitting*) y tienen olor a lavandina (Fig. 5).

Kingella

Al menos 4 especies se han aislado de materiales clínicos humanos:

Kingella kingae es la más importante. Es agente etiológico de endocarditis, infecciones osteoarticulares en niños menores de 4 años (2do. microorganismo en frecuencia después de *S. aureus*). Forma colonias beta-hemolíticas pequeñas.

Kingella denitrificans produce también endocarditis y presenta colonias pequeñas no hemolíticas. Como puede crecer en agar Thayer Martin se la puede confundir con *Neisseria gonorrhoeae*.

Kingella oralis puede producir periodontitis y *Kingella potus* infecciones posteriores a mordeduras de un animal exótico del norte de Sudamérica (kinkajou).

Otras bacterias similares

1) *Actinobacillus* spp. La mayoría de las especies son patógenas para animales de granja e infectan al hombre por exposición a los mismos. Son bacilos gram negativos de coloración bipolar, sus colonias son lisas o rugosas, a veces adherentes al agar, de 2 mm de diámetro.

2) *Capnocytophaga* spp. *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga haemolytica* y *Capnocytophaga granulosa* son parte de la microbiota oral humana y fueron descritas como agentes de septicemia y otras infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos. *Capnocytophaga canimorsus* y *Capnocytophaga cynodegmi* se han encontrado asociadas a infecciones posteriores a mordeduras de perros y gatos. Son extremadamente pleomórficas (formas fusiformes, filamentosas, de maza, con extremos bulbosos, etc.) cuando se las obtiene de frascos de hemocultivo o de agar sangre.

Sus colonias en agar sangre o agar chocolate desarrolladas en una atmósfera de 5% de CO₂ presentan una movilidad deslizante que no está determinada por la presencia de flagelos. La movilidad deslizante se ve como si la colonia se prolongara a lo largo de la estría, pero no se ven bacterias móviles entre porta y cubreobjetos.

3) *Dysgonomonas*. Se han descrito como productoras de diarrea en huéspedes inmunocomprometidos, aunque también fueron aisladas de casos de bacteriemia, infecciones urinarias e infecciones de heridas. Las colonias son puntiformes a las 24h, pueden ser opacas o brillantes, presentan un olor a frutilla y no se adhieren ni presentan movilidad deslizante.

4) *Streptobacillus moniliformis*. Está asociada a mordeduras de rata en el hemisferio occidental. El cuadro es de fiebre, escalofríos, poliartritis y *rash*. Forma colonias de 1 a 3 mm a las 48-72h de incubación en agar sangre. En medio líquido desarrolla en forma granular.

5) *Suttonella indologenes*. Es un patógeno raro (infecciones oculares, endocarditis). Las colonias pueden perforar el agar.

En la tabla 4 podemos ver las pruebas mínimas para orientarnos en la identificación a nivel de género.

***Haemophilus* spp.**

Los miembros del género *Haemophilus* son parásitos obligados que forman parte de la microbiota habitual del aparato respiratorio humano y de muchos animales. Son bacilos pequeños gram negativos, inmóviles, no esporulados y pleomorfos. Son anaerobios facultativos y producen energía,

ya sea por oxidación o por fermentación. Pueden tener formas que van desde cocobacilos hasta bacilos filamentosos pero predominan las formas cocobacilares. Las cepas aisladas en infecciones invasivas son frecuentemente capsuladas. In vitro requieren factores accesorios para su crecimiento: factor V (NAD) y algunas especies factor X (hemina).

Tabla 4. Pruebas mínimas para la orientación en la identificación de bacilos gram negativos de desarrollo dificultoso

Microorganismo	CAT	OXI	NIT	IND	URE	ORN	MOV	ONPG
<i>A. aphrophilus</i>	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	+	+/-	+	-	-	-	-	-
<i>Cardiobacterium</i> spp.	-	+	-	+	-	-	-	ND
<i>Eikenella corrodens</i>	-	+	+	-	-	+	-	ND
<i>Kingella</i> spp.	-	+	+/-	-	-	-	-	ND
<i>Actinobacillus</i> spp.	+/v	+	+	-	+	ND	-	+/-
<i>Capnocytophaga</i> spp. (1)	-	-	-/+	-	-	ND	+	+/-
<i>Capnocytophaga</i> spp. (2)	+	+	-/+	-	-	ND	+	+
<i>Dysgonomonas</i> spp.	-	-	-	+/-	-	ND	-	+
<i>S. moniliformis</i>	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Suttonella indologenes</i>	v	+	-	-	-	-	-	ND

CAT: catalasa, OXI: oxidasa, NIT: reducción de nitratos a nitritos, IND: indol, URE: ureasa, MOV: movilidad deslizante, ORN: ornitina descarboxilasa, ONPG: Orto-nitrofenilgalactósido. ND: no se dispone de datos, v: variable

Su crecimiento óptimo se obtiene incubando las placas en atmósfera de 5 % de CO₂ a 35–37°C. Por su requerimiento de factores son bacterias exigentes y crecen solamente en medios enriquecidos (agar chocolate o agar chocolate suplementado) o con una fuente exógena de los nutrientes esenciales (satelitismo alrededor de una estría de *Staphylococcus aureus* o aporte de los nutrientes específicos).

Forman colonias pequeñas, translúcidas y ciertos biotipos presentan un olor característico por producción de indol a partir de triptófano (Fig. 3).

Caracterización:

La especie *H. influenzae* es la más frecuentemente aislada de materiales clínicos. Es responsable de diversas enfermedades en humanos: otitis media, sinusitis, artritis séptica, neumonía, meningitis. Otras especies están implicadas en enfermedades de transmisión sexual (*H. ducreyji*) y conjuntivitis.

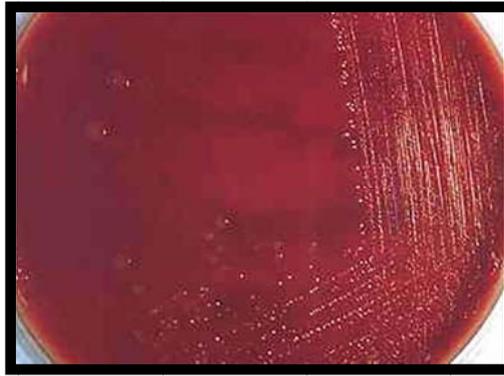


Figura 3. *Haemophilus influenzae*: desarrollo en agar chocolate

H. influenzae puede poseer cápsula (cepas serotificables a, b, c, d, e, f) o no (cepas no serotificables). El serotipo b ha sido el más importante como patógeno productor de infecciones invasivas (artritis séptica, neumonía, meningitis en niños). Su disminución en la actualidad se debe al impacto generado por la vacuna dirigida específicamente hacia él. En otitis media, tanto antes como después de la vacuna contra el serotipo b de *H. influenzae*, las cepas prevalentes han sido las no tipificables. En este contexto, raramente se aíslan cepas de *H. parainfluenzae* o *H. influenzae* de tipo b o capsulados no b*.

* En un estudio argentino de 122 aislamientos de *H. influenzae* de oído medio, 119 fueron no tipificables, y los otros 3 restantes pertenecían a los serotipos a, b y d. (Reijtman V, Fossati S, Hernández C, Sommerfleck P, Bernáldez P, Litterio M, Berberian G, Regueira M, Lopardo H. Serotype distribution of pneumococci isolated from pediatric patients with acute otitis media and invasive infections, and potential coverage of pneumococcal conjugated vaccines. Rev Argent Microbiol 2013; 45: 27-33)

Las especies de *Haemophilus* pueden diferenciarse entre sí a través de las pruebas que se detallan en la tabla 5.

Diagnóstico de laboratorio

Requerimiento de los factores V y X. Se basa en la necesidad de *H. influenzae* de requerir uno o ambos factores para su crecimiento (Fig. 4, Cuadro 5, Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de las especies de *Haemophilus*

<i>Haemophilus</i> spp.	Factores		Hem	Fermentación de				CAT	Mejor desarrollo en CO ₂
	X	V		GLU	SAC	LAC	MAN		
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+

<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	V	V
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	-

Factores: requerimiento de factores V y X para desarrollar; Hem: hemólisis en agar sangre ovina; GLU: glucosa, SAC: sacarosa, LAC: lactosa, MAN: manitol, CAT: catalasa

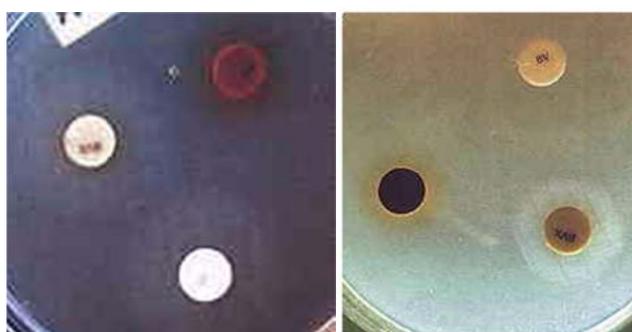


Figura 4. A. Bacteria que requiere sólo de factor V (*H. parainfluenzae*). Desarrolla alrededor de los discos V y VX. B. Bacteria que requiere ambos factores, V y X (*H. influenzae*). Desarrolla sólo alrededor del disco VX.

En la prueba de porfirinas se pone de manifiesto la capacidad de un microorganismo de sintetizar el grupo hem. El ácido delta-aminolevulínico es convertido enzimáticamente en porfobilinógeno, produciendo una fluorescencia roja.

Cuadro 5. Prueba del requerimiento de factores V y X

Fundamento
Las bacterias que requieren hemina y/o NAD pueden hacerlo en un medio exento de esos factores (por ejemplo, agar tripteína de soja) si se colocan discos impregnados en los mismos. De este modo, desarrollan alrededor del disco que le aporta el o los factores correspondientes (X = hemina, V = NAD, o XV = ambos factores)
Método
Se prepara un inóculo mediante la resuspensión de 3 a 5 colonias en caldo o solución fisiológica (puede ser el mismo que se emplea para hacer el antibiograma). Se efectúa un hisopado en una placa de agar tripteína de soja con el inóculo del microorganismo a identificar. Se aplican los discos con factores X, V y la combinación XV. Se incuba 18–24h a 35°C, en atmósfera con 5% de CO ₂ y se observa el desarrollo alrededor de los discos.

Interpretación
<i>Desarrollo alrededor del disco XV = tiene requerimiento de ambos factores: probable H. influenzae o H. haemolyticus</i>
<i>Desarrollo alrededor de los discos V y VX = tiene requerimiento sólo del V: es un microorganismo capaz de sintetizar el grupo hem a partir de ácido α-aminolevulínico. (probable H. parainfluenzae o H. parahaemolyticus). Esto se puede comprobar con la prueba de porfirinas (Fig. 5)</i>
<i>Desarrollo alrededor del disco X = tiene requerimiento solo del X: no pertenece al género Haemophilus (excepción: H. ducreyi, agente etiológico del chancro blando)</i>
<i>Desarrollo en toda la placa = no tiene requerimiento de factores: no pertenece al género Haemophilus</i>

Luego, la reacción continúa y la presencia de porfirinas puede ponerse de manifiesto con el agregado de reactivo de Kovacs. Se observará una coloración rojiza en la fase acuosa. Esta prueba confirma la independencia del factor X. La reacción bioquímica es la del cuadro 6.

Cuadro 6. Prueba de porfirinas

Reacción
delta-aminolevulínico → porfobilinógeno → uroporfirinógeno → coproporfirinógeno → protoporfirina IX → hemina Fe ⁺⁺
Método
Se prepara una suspensión bien cargada del microorganismo en un <i>buffer</i> de fosfatos 0,1 M (pH 6,9) que contenga 2 mM de ácido delta-aminolevulínico y 0,8 mM de MgSO ₄ . Se incuba 4 h a 37° C. El tubo se ilumina con luz ultravioleta observando una fluorescencia roja (presencia de porfobilinógeno).
Interpretación
<i>Interpretación:</i> la fluorescencia roja señala la conversión del ácido delta-aminolevulínico a porfirinas. Eso indica que el microorganismo no requiere factor X (probable <i>H. parainfluenzae</i>). Alternativamente, a las 24 h puede revelarse con reactivo de Kovacs (rojo en fase acuosa = positivo → presencia de porfirinas).

Bordetella

Los microorganismos del género *Bordetella* son parásitos obligados del hombre y de los animales, y ocupan sitios específicos en las membranas mucosas del tracto respiratorio. Mientras *Bordetella*

bronchiséptica se encuentra principalmente en conejos, perros, cerdos y otros animales domésticos y esporádicamente infecta al hombre, *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* son exclusivamente patógenos humanos.

B. pertussis es el principal agente de la tos convulsa, coqueluche o síndrome pertusis y se asocia a los casos más graves. No obstante, *B. parapertussis*, *Chlamydia trachomatis* y los virus respiratorios también pueden originar cuadros similares. Este hecho constituye un factor determinante para que el diagnóstico etiológico cobre no sólo importancia documental, sino también interés clínico-epidemiológico.

El período de incubación de la enfermedad es de 5 a 7 días. Se divide en tres fases: catarral, paroxística y convaleciente.

Fase catarral

Corresponde a las manifestaciones clínicas de los fenómenos inflamatorios de las vías aéreas superiores. Comienza con tos. Se acompaña de coriza, rinorrea y, ocasionalmente, de fiebre leve o moderada. Los síntomas y signos mencionados son inespecíficos y generalmente se consideran como una expresión de una infección corriente de las vías aéreas superiores. Durante este período de dos semanas de duración, *B. pertussis* se puede aislar de cultivos nasofaríngeos.

Fase paroxística

En la fase paroxística la tos seca no productiva pasa a ser una tos paroxística con producción de mucus y vómitos. Esta fase se caracteriza entonces por la presentación de accesos o quintas de tos (de allí su nombre de tos quintosa). El primer movimiento respiratorio que inicia la crisis es una inspiración no ruidosa, seguida de inmediato por una serie de sacudidas rápidas (de cinco a veinte), con el tórax fijo en inspiración. Luego se produce la apnea que a veces puede llevar a la cianosis y, finalmente, termina con una inspiración sibilante y ruidosa. Este episodio se repite hasta que el niño vomita o expectora una secreción filante, con aspecto de clara de huevo cruda. En ocasiones se presentan convulsiones. Los pacientes pueden presentar pérdida de peso, ocasionalmente, hipoglucemia y, raramente, encefalopatías. En el análisis de los elementos sanguíneos se observa una marcada leucocitosis con predominio de linfocitos.

Paradójicamente, el aislamiento del microorganismo resulta progresivamente más difícil después del primer ataque de tos de la fase paroxística. La mayoría de las manifestaciones clínicas se deben a la presencia de toxinas liberadas por el microorganismo y a su diseminación sistémica.

Fase de convalecencia

Se caracteriza por la disminución gradual y progresiva de los accesos de tos. Las espiraciones forzadas disminuyen en número e intensidad y, paulatinamente, se van interponiendo entre las crisis, otras de tos corriente. La duración de la convalecencia puede ser de hasta tres o cuatro meses.

Transmisión

La enfermedad se transmite por aerosoles generados por la tos. El paciente permanece infectante desde la segunda semana hasta los tres meses posteriores al comienzo de la fase catarral.

Cuando la enfermedad no cursa con complicaciones, la duración de la misma es de 6 semanas.

La enfermedad en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes inmunizados, es atípica; los pacientes presentan tos persistente y prolongada (durante semanas o meses). En estos pacientes pueden estar ausentes los tres estadios típicos de *pertussis*, así como también la linfocitosis. Este grupo etario, que en general está subdiagnosticado, sería el principal reservorio para la transmisión de *B. pertussis*.

Bordetella pertussis

El bacilo de Bordet-Gengou (*B. pertussis*) es el principal agente etiológico de la tos convulsa, pero también se mencionan como tales a *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*

B. pertussis es un cocobacilo gram negativo, lábil, que necesita para su aislamiento primario de medios de cultivo adicionados con nutrientes especiales, 95% de humedad y una temperatura de 35 - 36°C. La muestra para estudio de *B. pertussis* debe ser tomada durante los 7 a 14 días después del inicio de los síntomas, debido a que es el período en el cual el microorganismo se encuentra en la nasofaringe del paciente con tos ferina.

B. pertussis es un microorganismo de crecimiento lento aún en condiciones de cultivo favorables. Requiere glutamato y/o prolina como principales fuentes de carbono y energía, y ácido nicotínico o nicotinamida, glutatión y cisteína como factores de crecimiento. Si bien los requerimientos nutricionales parecen ser simples, este microorganismo es difícil de cultivar debido a otros aspectos tales como su sensibilidad a la inhibición ejercida por sustancias (todavía no totalmente identificadas) que están presentes en determinados medios de cultivo. En un principio, para superar el efecto de estas sustancias, se agregaron aditivos a los medios de cultivo, como sangre, albúmina, etc., como en el medio de Bordet-Gengou que lleva sangre bovina al 10%, papa y glicerina.

La muestra de elección es el aspirado nasofaríngeo con sonda estéril. En segundo lugar, el hisopado nasofaríngeo con hisopos de dacrón (no de algodón) y como última opción, esputo, pero no es recomendable (cuadro 7). Una alícuota de la muestra se utiliza para el cultivo y otra para los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En caso de ser transportada para el cultivo es conveniente colocarla en medio transporte de Regan-Lowe (ver composición más abajo), o en una solución al 1% de casaminoácidos o en solución fisiológica. No conservar la muestra congelada.

A partir del medio de transporte se siembra la muestra en agar Bordet Gengou o Regan Lowe sin y con cefalexina (40 µg/ml) suplementado con sangre de caballo o carnero desfibrinada (7-15% v/v). Todas las muestras se incuban al menos por 10 -14 días a 37°C en aerobiosis y 95% de humedad

(Cuadro 7). Las colonias sospechosas de *B. pertussis* (como gotas de mercurio y hemolíticas en el medio de Bordet-Gengou) se confirman con pruebas bioquímicas (ver Fig.6 y tabla 6) y PCR.

Cuadro 7. Procesamiento de muestras para estudio de *Bordetella pertussis*

Muestras
1- Aspirado nasofaríngeo. 2- Hisopado nasofaríngeo con hisopos de dacrón o rayón (no usar hisopos de algodón). 3- Espujo (no es recomendable en niños, pero se usa en adultos). Para el cultivo, el tiempo de demora en el procesamiento es crítico.
Transporte
<ul style="list-style-type: none"> • Por 4 h: solución de 0,5-1,0% de casaminoácidos o Regan-Lowe al medio, a temperatura ambiente. • Por 4 – 24 h solución de 0,5-1,0% de casaminoácidos con carbón activado o Regan Lowe al medio, a 4°C.

Tabla 6. Pruebas para la diferenciación de especies de *Bordetella*

Pruebas	<i>Bp</i>	<i>Bpp</i>	<i>Bbs</i>	<i>Ba</i>	<i>Bhz</i>	<i>Bhs</i>	<i>Bt</i>
Colonias visibles a los...	3 días	1-2 días	1 día	1 día	2 días	2-3 días	ND
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	+	+	+	-	-
Nitrato	-	-	+	-	-	-	v
Movilidad	-	-	+	+	+	-	+
Ureasa	-	+ (24 h)	+ (4h)	-	v	-	-
Hemólisis	+	+	v	v	ND	-	ND
Mac Conkey	-	v (lento)	+	+	+	+ (lento)	+

Bp: *Bordetella pertussis*; *Bpp*: *Bordetella parapertussis*; *Bbs*: *Bordetella bronchiseptica*; *Ba*: *B. avium*; *Bhz*: *Bordetella hinzii*; *Bhs*: *Bordetella holmesii*; *Bt*: *Bordetella trematum*



Figura 6. Colonias de *Bordetella pertussis* en medio de Bordet-Gengou

Bordetella parapertussis y *Bordetella bronchiseptica* son dos especies estrechamente relacionadas con *B. pertussis* y son responsables de las formas moderadas de la enfermedad respiratoria en el hombre y en animales. Las tres especies colonizan el tracto respiratorio adhiriéndose a las cilias de la mucosa, poseen antígenos de superficie comunes, producen toxinas y las tres pueden sufrir procesos de variación de fase (virulenta-avirulenta).

El diagnóstico se confirma por el laboratorio con el cultivo o con PCR. La serología es de menor valor, pero se la utiliza en adultos, porque generalmente su consulta es tardía.

Brucelosis y *Brucella*

La brucelosis, fiebre de Malta o fiebre ondulante es una zoonosis que afecta al hombre y a muchos animales. Bruce la describió en la isla de Malta en el siglo XIX y desde entonces se observó que su difusión era universal. Los países americanos con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú.

El género *Brucella* comprende las especies *Brucella melitensis* (de las cabras de Malta estudiadas por Bruce y ovejas), *Brucella abortus*, proveniente originariamente de abortos de ganado bovino, *B. suis* de cerdos (ganado suino), *Brucella canis* de perros y otras de menor importancia en clínica humana (tabla 7).

Tabla 7: Especies más importantes del género *Brucella* y sus principales hospedadores

Especies	Patogenicidad para el hombre	Hospedador preferido
<i>B. melitensis</i>	Alta	Cabras y ovejas
<i>B. abortus</i>	Moderada	Bovinos
<i>B. suis</i>	Alta	Cerdos
<i>B. canis</i>	Baja	Perros

Estas bacterias pueden sobrevivir en el suelo durante largos períodos en condiciones de temperatura y humedad adecuadas. La especificidad de hospedador tendría que ver con ciertas características genéticas (pérdida de genes durante la adaptación al estilo de vida intracelular).

En los animales, *Brucella* spp. produce infecciones generalizadas con una fase bacteriémica seguida por localización en los órganos reproductivos y en el sistema retículoendotelial.

El hombre adquiere la infección por *Brucella canis* a partir de su contacto con perros infectados. El contagio con *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. suis* puede darse por:

- (1) Contacto directo con animales infectados (veterinarios, ganaderos, peones de campo).
- (2) Contacto con productos animales durante la faena (matarifes, carniceros, entre otros).
- (3) Alimentos contaminados.
- (4) Accidentes de laboratorio.
- (5) Transfusión sanguínea o trasplante de médula ósea.

B. melitensis y *B. suis* son las especies más patógenas, *B. abortus* y *B. canis* son moderadamente patógenas y las otras especies no afectan al ser humano.

Brucella llega al organismo a través del tubo digestivo, por vía respiratoria (a través de aerosoles, especialmente en frigoríficos) o a través de la piel y mucosas (por pequeñas escoriaciones que incluso pueden resultar imperceptibles). No se transmite persona a persona, excepto a través de la lactancia.

La enfermedad consiste en un cuadro febril con malestar y decaimiento, pero incluso puede cursar en forma subclínica. Los síntomas aparecen por lo general entre 2 y 3 semanas después de la infección. A veces puede comprometer algún órgano en particular (enfermedad localizada o complicada). Las complicaciones más frecuentes son las osteoarticulares, las hepáticas y, en menor medida, se observan complicaciones neurológicas como meningitis aguda o crónica.

Los métodos serológicos de tamizaje [aglutinación con antígeno tamponado (BPA), Rosa de Bengala (RB), aglutinación en placa (Huddleson) o microaglutinación para *B. canis* (RSAT)] indican probabilidad de que un paciente padezca brucelosis. El diagnóstico se confirma con un cultivo positivo para *Brucella* sp., estudios serológicos positivos (por ejemplo, prueba de Wright) o nexos epidemiológicos con un caso confirmado.

Brucella no posee toxinas, proteasas, ni fimbrias. La bacteria se adhiere a células de la piel o mucosas, penetra en tejidos más profundos para lo cual interviene el LPS, llega a los linfáticos y resiste la fagocitosis, internándose en una vacuola de los fagocitos donde se replica.

Características culturales e identificación

Se trata de bacterias clasificadas dentro del grupo de riesgo III de bioseguridad para la OMS. Esto implica la utilización de cámara de seguridad, guantes, antiparras y camisolín, como mínimo, para el manipuleo de las muestras de hemocultivo.

Estas bacterias se pueden aislar a partir de hemocultivos, pero también de médula ósea (por punción esternal o de cresta ilíaca). En los casos complicados se las aísla también de líquido cefalorraquídeo, líquido articular, biopsia hepática u otros materiales. Se recomienda tomar tres muestras de hemocultivo dentro de un período de 24 h cuando el paciente se encuentre febril. Los hemocultivos deben incubarse hasta 30 días con subcultivos semanales. La incubación de los subcultivos se realiza a 37°C en 5-10 % de CO₂. La mayoría de las especies de *Brucella* crecen muy lentamente en los primocultivos. Sus requerimientos nutricionales son complejos pero desarrollan en agar sangre. Son microorganismos aerobios, pero algunas especies requieren condiciones de microaerobiosis con 5% de CO₂. Las colonias son pequeñas, translúcidas y de borde liso y aparecen a las 48 h de incubación. En la coloración de Gram se ven como pequeños cocobacilos gram negativos que pueden estar en pares o agrupados. No presentan coloración bipolar ni cápsula. Son oxidasa y catalasa positivos. Son microorganismos inmóviles, no hemolíticos y dan negativas las pruebas de indol, gelatina, Voges Proskauer y rojo de metilo. No producen ácidos en medios con carbohidratos. Su característica principal es que dan la prueba de ureasa fuertemente positiva. Algunas especies, incluso en término de minutos. Se diferencian de otros microorganismos parecidos por las pruebas de la tabla 8.

La identificación a nivel de especie se realiza en centros de referencia y, además de métodos moleculares, implica la realización de pruebas de tolerancia a colorantes (safranina, fucsina, tionina, pironina, verde de malaquita) y sensibilidad a antibióticos como penicilina y estreptomina.

El tratamiento consiste en la administración precoz de antibióticos como tetraciclinas o trimetoprima-sulfametoxazol, asociadas a estreptomina durante varias semanas.

Tabla 8: Características diferenciales del género *Brucella*

Pruebas	Resultado para <i>Brucella</i>
Catalasa	positiva
Oxidasa	positiva
Morfología	cocobacilar
Movilidad a 25°C	negativa
Fermentación de glucosa	negativa
Fermentación de lactosa	negativa
Hemólisis	negativa
Ureasa	positiva
Nitrato	positiva
Citrato	negativa

Enfermedad de los Legionarios y *Legionella*

Las bacterias del género *Legionella* son bacilos gram negativos no esporulados, de 0,3 a 0,9 µm de ancho y de largo variable: formas cortas de 1,5 a 2 µm de largo y filamentos de mayor longitud. En los extendidos directos de muestras clínicas generalmente se ven las formas cortas y delgadas, de apariencia cocobacilar.

Excepto tres especies no móviles y muy infrecuentes, el resto de las especies de *Legionella* son móviles debido a la presencia de uno o más flagelos polares o subpolares.

Son microorganismos aerobios y exigentes desde el punto de vista nutricional. Requieren L-cisteína y sales de hierro para su desarrollo, sustancias que están presentes en el medio agar-extracto de levadura-carbón activado (BCYE). No desarrollan en agar-sangre, aunque sí pueden crecer lentamente en agar chocolate.

Patología en el hombre

L. pneumophila es el agente etiológico de la llamada enfermedad de los legionarios. Esta enfermedad fue descrita por primera vez como brote epidémico de neumonía grave en una convención de Legionarios realizada en Filadelfia, EE.UU., en 1976.

Son agentes de neumonía aguda grave de la comunidad, pero también se pueden adquirir en el hospital. Las legionelas también pueden provocar una variante más benigna de la enfermedad de los legionarios, conocida como fiebre de Pontiac.

La infección por *Legionella* también puede afectar áreas anatómicas extrapulmonares. Se han comunicado casos de bacteriemia; manifestaciones asociadas con el sistema nervioso central (cefaleas, letargo, confusión, estupor). Otros pacientes presentan signos y síntomas focales de absceso cerebral o encefalitis.

La legionelosis debe ser incorporada en el diagnóstico diferencial de:

- Pacientes inmunosuprimidos que desarrollan un cuadro de fiebre con infiltrados pulmonares.
- Pacientes que desarrollan una neumonía que no responde a las penicilinas, las cefalosporinas o los aminoglucósidos.
- Pacientes con neumonía grave.
- Otros factores de riesgo: diabetes, alcoholismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardiovascular.
- Brote de neumonía en un grupo de pacientes que han estado expuestos a una fuente potencial generadora de aerosoles en un ambiente común.

Aspectos epidemiológicos y patogenia

Las especies de *Legionella* son ubicuas en la naturaleza. Viven en medios acuáticos, parasitando amebas de vida libre.

Las vías de transmisión más probable consisten en la inhalación de microorganismos aerosolizados en el aire atmosférico desde fuentes ambientales y, posiblemente, en la aspiración de microorganismos presentes en el agua.

La invasión al tracto respiratorio inferior se produce porque estos microorganismos también tienen la capacidad de parasitar a los fagocitos, quienes las transportan hacia tejidos más profundos.

Diagnóstico de laboratorio

Las muestras adecuadas son: esputo expectorado, material recolectado mediante broncoscopia (por ejemplo, material de cepillado, biopsia o lavados bronquiales), material obtenido por biopsia a cielo abierto, punción pulmonar y líquido pleural.

Como toda muestra respiratoria, debe recolectarse en forma cuidadosa para evitar la dispersión de las bacterias en la atmósfera. El transporte al laboratorio debe efectuarse a temperatura ambiente, en recipiente estéril, dentro de las 2 h posteriores a la recolección. Si se deben almacenar por más tiempo, hay que refrigerarlas.

Examen directo de las muestras

Se pueden utilizar las siguientes coloraciones: Gram, Giemsa y Kinyoun modificado. Puede incluirse asimismo la inmunofluorescencia directa y el uso de sondas de ácidos nucleicos.

Aislamiento a partir de muestras clínicas

El método de referencia para el diagnóstico de la legionelosis es el cultivo, pero es lento y dificultoso. Actualmente, se prefieren los métodos moleculares. El medio sólido no selectivo recomendado para el aislamiento de especies de *Legionella* es el agar extracto de levadura carbón activado (BCYE), compuesto por L-cisteína, pirofosfato férrico, ácido α -cetoglutarico y carbón activado.

Generalmente, las colonias de *Legionella* aparecen en el medio después de 2 a 3 días de incubación en las áreas sembradas con inóculos densos. En casos donde la concentración de microorganismos es muy baja, la aparición de colonias aisladas puede demorarse varios días más. Las colonias son brillantes, convexas, circulares y ligeramente irregulares y de borde entero.

Las presuntas colonias de *Legionella* deben subcultivarse en un medio de agar sangre ovina al 5% no suplementado o en medio BCYE sin L-cisteína y en el medio BCYE suplementado. Los microorganismos que proliferan en agar sangre, en BCYE sin L-cisteína u otros medios de rutina (por ejemplo, agar MacConkey) probablemente no pertenezcan al género *Legionella*.

Pruebas bioquímicas

No fermentan ni oxidan los carbohidratos. Producen ácidos grasos de cadena ramificada, característicos en su pared celular.

La mayoría de las especies son, débilmente, catalasa positivas y, con excepción de algunas especies, licúan la gelatina.

La prueba de hidrólisis del hipurato de sodio es positiva para *Legionella pneumophila* y negativa para la mayoría de las otras especies de *Legionella* aisladas de materiales clínicos. Esto permite realizar una diferenciación presuntiva.

La caracterización fenotípica de los aislamientos de *Legionella* mediante pruebas bioquímicas posee un valor limitado para la identificación presuntiva de los aislamientos hasta el nivel de especie. Un método práctico es la serotipificación mediante el uso de los anticuerpos fluorescentes. La identificación definitiva de las especies de *Legionella* requiere de estudios moleculares.

Francisella

Se han descrito dos especies pertenecientes a este género en infecciones humanas: *Francisella philomiragia* (un patógeno oportunista) y *Francisella tularensis*.

Esta última es el agente etiológico de la tularemia, una enfermedad caracterizada por fiebre alta, cefaleas y escalofríos, que puede progresar hacia una septicemia de alta mortalidad (30-60%). También puede producir cuadros más leves: úlceras, linfadenopatía, conjuntivitis e, incluso, más graves, como la neumonía.

Es una enfermedad del hemisferio norte, que se contrae por manipuleo de cadáveres de animales infectados: ciervos, roedores, por inhalación o por mordedura.

Su aislamiento es dificultoso, requiere de medios enriquecidos como el agar sangre con cistina y cisteína. No requieren CO₂ y las colonias aparecen recién entre los 2 y los 4 días de incubación. Ante la sospecha clínica, las muestras se deben enviar a centros de referencia ya que se requiere trabajar con nivel de seguridad III.

Bartonella y Afipia

El género *Bartonella* incluye 16 especies, aunque son cinco las que tienen importancia en clínica humana. *Afipia felis* es la única especie en su género. Sus características patogénicas se reúnen en la tabla 9.

La verruga peruana y la enfermedad de Carrión son dos manifestaciones de la misma enfermedad endémica en Perú. Una de ellas es de carácter benigno, y se caracteriza por la aparición de nódulos cutáneos y la otra, grave, septicémica, que se presenta con anemia, fiebre y malestar general. El agente causal es *Bartonella bacilliformis*.

La fiebre de las trincheras es una enfermedad histórica, que afectó a miles de soldados entre los siglos XIX y XX. Consiste en cefaleas, dolor óseo, esplenomegalia (aumento de tamaño del bazo) y presencia de un eritema maculopapular de corta duración. Es transmitida por piojos y el agente causal es *Bartonella quintana*. Actualmente es un agente muy raro de bacteriemia con o sin endocarditis y angiomatosis en huéspedes inmunocomprometidos (HIV +).

La angiomatosis bacilar, también debida a *Bartonella henselae*, es una enfermedad vascular proliferativa que afecta la piel, el hígado, el bazo y/o los ganglios linfáticos.

La enfermedad por arañazo de gato por *B. henselae* es bastante frecuente en niños y se caracteriza por la aparición de pápulas en el sitio de la lesión, seguida de linfadenopatía regional.

Estos microorganismos desarrollan en medios de cultivo comunes como el agar sangre, pero lo hacen muy lentamente (12-14 días). Se diagnostican frecuentemente por métodos serológicos o moleculares.

Hay otras especies, pero son mucho más raras en patología humana (tabla 9).

Tabla 9. *Bartonella* y *Afipia* como patógenos humanos (modificada de Forbes et al, 2011)

Microorganismo	Hábitat	Modo de transmisión	Manifestaciones clínicas
<i>B. bacilliformis</i>	Desconocido	Mosca	Verruga peruana y enfermedad de Carrión
<i>B. quintana</i>	Roedores o seres humanos	Piojo (humano)	Fiebre de las trincheras
<i>B. henselae</i>	Gatos	Arañazos, mordeduras o picaduras de pulgas de gatos	Bacteriemia, endocarditis, enfermedad por arañazo de gato, angiomatosis bacilar, peliosis hepática, neurorretinitis
<i>B. clarridgeae</i>	Gatos	Arañazos, mordeduras o picaduras de pulgas de gatos	Bacteriemia, enfermedad por arañazo de gato
<i>B. elizabethae</i>	Ratas	Picaduras de pulgas	Endocarditis
<i>Afipia felis</i>	Gatos	Arañazos, mordeduras o picaduras de pulgas de gatos (posible)	Posiblemente enfermedad por arañazo de gato

2d. Bacilos gram negativos oxidasa positivos fermentadores de glucosa: *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas*

Se trata de bacilos gram negativos, oxidasa positivos, móviles, fermentadores de glucosa, que desarrollan en agar MacConkey. Son habitantes habituales de medios acuáticos y no forman parte de la flora normal del hombre. La transmisión se da por ingestión de agua o mariscos contaminados o exposición de piel o mucosas dañadas. Para diferenciar entre estos géneros se puede recurrir a la tabla 10.

Aeromonas

Se describieron al menos 15 especies de *Aeromonas*. Las más frecuentes son: complejo *Aeromonas hydrophila* (5 especies), complejo *Aeromonas caviae* (3 especies) y *Aeromonas veronii* (2 biovares)

Aeromonas produce enfermedades gastrointestinales especialmente en niños mayores de un año. Su presencia en materia fecal debe ser valorada con precaución porque no siempre es el agente causal de la diarrea. En niños menores de un año aparece frecuentemente en forma asintomática.

Además de diarreas agudas produce diarreas crónicas, infecciones de heridas en contacto con agua y sepsis en pacientes con enfermedades hematológicas y raramente en inmunocompetentes. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* produce un síndrome disenteriforme o una diarrea coleriforme ambas con dolor abdominal, fiebre y náuseas. *A. caviae* es la más frecuente en diarreas acuosas y en diarreas crónicas. *A. hydrophila* produce casos complicados de gastroenteritis y es la más frecuente en infecciones de heridas.

Aeromonas forma colonias grandes, elevadas, beta-hemolíticas. Para su identificación a nivel de especie se utilizan las pruebas de descarboxilasas, Voges Proskauer, fermentación de azúcares e hidrólisis de esculina (Tabla 11).

Son naturalmente resistentes a la ampicilina (excepto *Aeromonas trota*), por lo que se utiliza agar sangre con ampicilina para su aislamiento primario a partir de materia fecal. También son resistentes a cefalotina (excepto *A. veronii* y *Aeromonas schubertii*). Este medio se debe incubar 48 horas para poder ver mejor la hemólisis ya que *Aeromonas* produce las hemolisinas al final de la fase logarítmica y en la fase estacionaria de crecimiento. A las colonias hemolíticas se les efectúa una prueba de oxidasa. Si ésta es positiva, se realizan las pruebas bioquímicas de la tabla 10 para definir el género. Para diferenciar las especies de *Aeromonas* entre sí se puede recurrir a la tabla 11.

Tabla 10. Características diferenciales de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*

Prueba	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Plesiomonas</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Vibrio fluvialis</i>
Oxidasa	+	+	+	+

Catalasa	+	+	+	+
TSI	A/A con y s/ gas	Alc/A sin gas	A/A sin gas	A/A con y s/ gas
Indol	v	+	v	-
Lisina	-/+	+	+	-
Ornitina	-	+	+	-
Arginina	v	+	-	+
DNasa	+	-	v	+
Gelatina	+	-	+	v
Citrato	v	-	v	v
Manitol	+	-	+	+
Factor O/129 100µg	R	S	S	S

Todas son móviles, oxidasa y catalasa positivas

Plesiomonas shigelloides

Produce enfermedades gastrointestinales menos frecuentemente que *Aeromonas*.

En la nueva clasificación se la incluye dentro de las enterobacterias a pesar de ser oxidasa positiva. Forma colonias brillosas, lisas, no hemolíticas. En el TSI da alcalinidad en el pico y acidez en el fondo sin SH₂. Se diferencia de *Shigella* por su movilidad y por la prueba de oxidasa. Da positivas las pruebas de ADH, LDC y ODC.

Tabla 11. Características diferenciales de las especies de *Aeromonas*

	VP	E	LDC	ODC	ADH	In	Sac	Cef	Col
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	-	+	+	+	R	v
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	+	-	+	-	+	+	+	S	S
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	+	+	+	+	-	+	+	S	S
<i>A. caviae</i>	-	+	-	-	+	+	+	R	S
<i>A. schubertii</i>	v	-	v	-	+	-	-	S	S
<i>A. jandaei</i>	+	-	+	-	+	+	-	R	R
<i>A. trota</i>	-	-	+	-	+	+	v	R	S

VP: Voges Proskauer, E: esculina, LDC: lisina descarboxilasa, ODC: ornitina descarboxilasa, ADH: arginina dihidrolasa, In: indol, Sac: sacarosa, Cef: sensibilidad a cefalotina, Col: sensibilidad a colistina, v: variable.

Chromobacterium violaceum

No se asocia a enfermedades gastrointestinales sino que aparece contaminando heridas, produciendo celulitis o linfadenitis, abscesos múltiples y *shock séptico*.

Forma colonias lisas convexas, de color negro o púrpura oscuro característico. Algunas cepas son beta-hemolíticas y otras no pigmentadas (9%). Las pruebas de LDC, ODC, maltosa y manitol son negativas.

Vibrio

Son habitantes naturales del agua de mar. En el ambiente logran sobrevivir por largos períodos.

Son tolerantes al NaCl y excepto *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* (no halofílicos) requieren de esta sal para crecer.

El género *Vibrio* está compuesto por 12 especies de valor clínico potencial. Las más importantes son *V. cholerae* agente del cólera, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Esta última produce casos de septicemia primaria con 50% de mortalidad en huéspedes inmunocomprometidos, 24-48h después de la ingesta de mariscos crudos (Tabla 12).

Vibrio cholerae

Es un bacilo gram negativo delgado y curvo (en forma de coma) móvil por flagelos polares, anaerobio facultativo, fermenta sin producción de gas, Crece en caldo nutritivo sin agregado de sales, puede crecer en agar SS, es Voges Proskauer positivo, LIA y ODC positivo, muy sensible a los antibióticos pero resistente a colistina. Desarrolla entre 16° y 42°C, y a pH de 6,4 a 9,6. Presenta efecto suicida (se lisa) cuando el pH es menor de 4.

En agar sangre forma colonias grandes, lisas, iridiscentes y algunas cepas producen hemólisis beta.

Son sensibles al factor vibriostático O/129 (pteridina), aunque esta prueba no es del todo confiable para su diferenciación de otras bacterias similares. Dan positiva la prueba de la cuerda. Esta consiste en colocar una gota de solución de desoxicolato de sodio al 0,5% sobre una lámina de vidrio y suspender en ella una colonia de la bacteria. Con el ansa se trata de levantar una gota de esa mezcla y se observa "filancia" (formación de un hilo entre la gota y el ansa levantada).

Tabla 12. Factores de virulencia y tipos de infecciones producidas por las especies de *Vibrio* más frecuentes en clínica humana

Especie	Tipos de infecciones	Factores de virulencia
<i>V. cholerae</i>	Cólera	Toxina colérica, <i>pili</i> , hemolisina, antígeno O, movilidad

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis por ingesta de mariscos crudos	Hemolisina
<i>Vibrio fluvialis</i>	Gastroenteritis	Citotoxina
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Infecciones de heridas, otitis y sepsis	Desconocidos
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infecciones de heridas y septicemia por ingesta de mariscos crudos	Proteasas y cápsula

Desarrolla dando colonias amarillas en caldo TCBS por fermentación de la sacarosa (tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa) y en superficie en agua peptonada alcalina a las 6 horas.

V. cholerae se puede clasificar en distintos serogrupos según su antígeno somático O. El cólera (ver más adelante) es producido por los serotipos O1 u O139, mientras que los otros serotipos, denominados corrientemente como no O1 son agentes etiológicos de diarreas no coleriformes (Tabla 13). A su vez, por características bioquímicas, se distinguen dentro del serogrupo O1 los biotipos Clásico y El Tor (Tabla 14). El Clásico fue el responsable de la mayoría de las pandemias anteriores a 1960 y El Tor es el que se mantiene en forma endémica en algunos países como Bangla Desh y ha sido el que generó la última pandemia en América Latina en la década del 90. Dentro de O1 se distinguen los serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima (Tabla 13).

Tabla 13. Serogrupos, biotipos y serotipos de *Vibrio cholerae*

Serogrupo	Biotipo	Serotipo
O1	Clásico	Inaba
	El Tor	Ogawa
		Hikojima
O139		
Otros (no O1)		

Tabla 14. Pruebas bioquímicas para diferenciar los biotipos de *Vibrio cholerae*

Biotipo	Polimixina B	VP	β- hemólisis	Aglutinación
Clásico	S	Negativo	Débil o negativa	Negativa
El Tor	R	Positivo	Positiva	Positiva

S: sensible; R: resistente; VP: Voges Proskauer; Aglutinación: aglutinación de glóbulos rojos de pollo

Tabla 15. Supervivencia de *Vibrio cholerae* en distintos ambientes

Ambiente	Tiempo medio de supervivencia
Agua dulce	2 semanas
Agua de mar	1 año
Alimentos refrigerados	2 semanas
Superficie húmeda de frutas	2 semanas
Alimentos deshidratados	Menos de 2 días
Alimentos con pH < 3,5	1 día
Utensilios	4 – 48h

Vibrio cholerae logra sobrevivir en distintos ambientes (Tabla 15) y a veces puede permanecer por largos períodos en una forma viable pero no cultivable, lo que dificulta sobremanera la posibilidad de realización de estudios epidemiológicos y su erradicación.

Cólera

Se trata de una enfermedad caracterizada por deposiciones acuosas (como agua de arroz) que produce la deshidratación rápida del individuo y a veces, si no se logra compensar el déficit de agua a través de la administración parenteral de suero fisiológico, lo puede llevar a la muerte.

Más de siete pandemias a lo largo de la historia han producido una dramática reducción de población a lo largo del mundo. Es endémico en Bangla Desh y su permanencia ha hecho posible la aparición de brotes epidémicos en otros continentes incluyendo Sudamérica. Entre 1991 y 1992 se produjeron en esta zona, incluyendo la Argentina, más de 600.000 casos y 5.000 muertes en 20 países. *Vibrio cholerae* variedad EL Tor fue el causante de esta última pandemia que entró a Sudamérica.

Actualmente se ha propagado desde Haití hacia la República Dominicana, Cuba y México.

Para su búsqueda a partir de deposiciones coleriformes se siembra una placa de agar TCBS con la muestra y un tubo con agua peptonada alcalina. Este último se incuba durante 6 a 8 horas y se subcultiva en agar TCBS y agar sangre, tomando gotas del medio de cultivo cercanas a la superficie. Como se dijo, *V. cholerae* forma colonias amarillas sin SH₂ a las 24 horas de incubación. La alta concentración salina inhibe parte de la flora fecal asociada. A las colonias amarillas del TCBS agar se les realiza inicialmente la prueba de TSI y se siembran en una placa o tubo en pico de flauta de agar nutritivo. Este agar debe ser agar Brucella o Columbia y no agar Mueller Hinton ya que aquí también pueden crecer vibriones no coléricos. Del desarrollo en este agar se realiza la prueba de oxidasa. Ésta no se debe hacer de medios que bajen mucho el pH, ya que da resultados falsamente negativos. De este desarrollo también se realiza la prueba de

aglutinación con antisueros antivibrio grupo O1 (Ogawa, Inaba, e Hikojima) y O139 para separar los aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 de los no O1 u O139.

En el Cuadro 8 y en la Tabla 16 pueden verse los procedimientos para el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y otros vibrios.

Tabla 16. Esquema mínimo para diferenciar *Vibrio cholerae* de otras bacterias oxidasa positivas y que fermentan glucosa en TSI

Pruebas	<i>Vibrio cholerae</i> El Tor	<i>V.mimicus</i>	<i>Vibrio</i> spp. (otros)	<i>A. caviae</i>	<i>A.</i> <i>hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>Plesiomonas</i>
BHI	+	+	-	+	+	+	+
TSI	A/A	A/A	A/A o K/A	A/A	A/A	A/A	K/A
Sac	+	-	v	v	v	v	v
LDC	+	+	v	-	v	-	+
ODC	+	+	v	-	-	-	+
VP	+	-	v	-	v	+	+
ESC	-	-	v	+	v	-	-
AMP	v	S	v	R	R	R	S
AMS	S	S	S	R	R	R	S
COL	R	S	v	S	S	S	S
O129	R	R	v	S	S	S	v

BHI: crecimiento en caldo infusión cerebro corazón; TSI: agar hierro triple azúcar; SAC: sacarosa; LDC: lisina descarboxilasa; ODC: ornitina descarboxilasa; VP: Voges Proskauer; ESC: hidrólisis de la esculina; AMP: sensibilidad a la ampicilina; AMS: sensibilidad a ampicilina/sulbactama; COL: sensibilidad a la colistina; O129: sensibilidad al factor vibriostático O129; v: variable; + : más del 98% de las cepas positivas; - más del 98% de las cepas negativas; S: sensible; R: resistente. .

Cuadro 8. Esquema de trabajo para la búsqueda de *Vibrio cholerae* de materia fecal

Procedimiento	Observaciones
Gram y fresco	Sólo si la diarrea es coleriforme o hay algún nexo epidemiológico que permita sospechar la presencia de <i>V. cholerae</i>

Siembra en agar TCBS		Trabajar las colonias amarillas
Siembra en agua peptonada alcalina	6 h: Gram y fresco	Tomar de la superficie del caldo y subcultivar en agar sangre y TCBS
	Subcultivo en agar TCBS	Trabajar las colonias amarillas
	Subcultivo en agar sangre	Opcional: ver β -hemólisis
Agar Brucella o agar Columbia		Prueba de oxidasa y serología

Pasteurella

Son bacilos gram negativos cocoides que presentan coloración bipolar. No requieren factores X ni V y tampoco necesitan de la presencia de CO₂. Dan positivas las pruebas de oxidasa y catalasa, no son móviles, no desarrollan en agar MacConkey y fermentan la glucosa.

Se agrupan en 11 especies, la mayoría de las cuales dan positivas la prueba de indol y algunas, la de ureasa. Las especies más frecuentes son *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella dagmatis* y *Pasteurella canis*.

P. multocida

En el hombre se las aísla de infecciones posteriores a mordeduras de animales (son parte de la microbiota habitual del tracto respiratorio de muchos animales, especialmente mamíferos).

Un 10% de las infecciones por *P. multocida* son infecciones respiratorias frecuentemente sin nexo epidemiológico con exposición a animales. Se originan probablemente por inhalación.

Las infecciones más graves ocurren en pacientes inmunodeprimidos. Pueden ocurrir complicaciones que derivan en meningitis, artritis u otras localizaciones.

Participa de un 60-70% de las infecciones por mordeduras de gatos y de un 50% de las infecciones por mordeduras caninas. También se la ha aislado de infecciones posteriores a mordeduras de animales salvajes, ratas, conejos, cobayos, *hamsters*, comadrejas, etc.

Como factores de virulencia podemos contar la cápsula polisacárida, una citotoxina y los sistemas por los cuales utiliza el hierro libre en el organismo humano.

Crece bien en agar sangre y como se dijo previamente, no requiere CO₂. Forma colonias grisáceas, pequeñas, translúcidas lisas o rugosas, no hemolíticas con olor a humedad.

Es muy sensible a los antibióticos, incluyendo sensibilidad a discos de 2 unidades internacionales (UI) de penicilina (los habitualmente utilizados tienen una carga de 10UI). Es resistente natural a la amicacina y a la clindamicina.

CAPÍTULO 3

Cocos gram negativos

Neisseria y Moraxella catarrhalis

Los microorganismos del género *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis* (ex *Branhamella catarrhalis*, ex *Neisseria catarrhalis*), son cocos gram negativos, que se presentan generalmente en pares con lados adyacentes aplanados, característica responsable de su forma arriñonada o de grano de café en las preparaciones microscópicas, especialmente en el género *Neisseria*.

Moraxella catarrhalis es el único exponente no bacilar del género *Moraxella* que se encuentra en seres humanos. Se lo incluye en esta sección precisamente porque es necesario realizar el diagnóstico microbiológico diferencial respecto de las neiserias.

Las células individuales pueden variar en su tamaño de 0,6 a 1,5 μm , según la especie y origen del microorganismo. No producen endosporos y no son móviles. Fisiológicamente casi todas las cepas tienen requerimientos complejos para su crecimiento. Su temperatura óptima de desarrollo es de 35°C a 37°C y degradan pocos o ningún hidrato de carbono. Todos son aerobios estrictos y producen las enzimas citocromooxidasa y catalasa (en este último caso, a excepción de *N. elongata*, que es una neiseria de morfología bacilar).

Su habitat natural son las mucosas de animales de sangre caliente. Solamente dos especies: *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* se consideran patógenas primarias (pueden infectar a individuos previamente sanos) y ambas infectan solamente al hombre. El resto son oportunistas y se las aísla muy esporádicamente a partir de infecciones humanas.

Neisseria meningitidis

Se trata de cocos gram negativos que se presentan en pares con sus caras adyacentes aplanadas. Este microorganismo sobrevive poco en el ambiente y, como no tiene otro huésped, su principal reservorio es el ser humano.

Se aíslan más comúnmente en la garganta o en la nasofaringe de personas asintomáticas, portadoras de este microorganismo durante períodos variables.

En un pequeño porcentaje de individuos colonizados, estas bacterias se diseminan desde la nasofaringe a través del torrente circulatorio para producir meningococcemia y/o meningitis. La meningococcemia consiste en una septicemia que puede progresar rápidamente causando la muerte en pocas horas de una persona previamente sana por coagulación intravascular diseminada, impactando en varios órganos. Algunos sobrevivientes pueden llegar a tener el compromiso necrótico de miembros superiores o inferiores, que pueden derivar en la amputación de los mismos.

La meningitis por meningococo puede tener connotaciones epidémicas. Se conocen varios serotipos capsulares. Los más importantes son el A (epidémico y prácticamente inexistente en la Argentina, frecuente en el África subsahariana), el B (frecuente en todo el mundo), el C, el W135 (en aumento en la Argentina y especialmente en Chile), el X y el Y.

Los meningococos también pueden producir artritis (que es una complicación de la meningococcemia) y rara vez conjuntivitis purulenta, sinusitis, endocarditis y neumonía primaria.

Las infecciones graves por meningococo pueden prevenirse con vacunación. Hay vacunas monovalentes que cubren sólo el serogrupo C, hay otras bivalentes A + C y tetravalentes A, C, W135, Y, y muy recientemente se desarrolló una vacuna para el serotipo B, poco antigénico y por lo tanto de difícil preparación.

Tabla 1. Diferenciación de las bacterias del género *Neisseria* respecto de otras similares

Especie	Morfología	Oxidasa	Catalasa	DNasa
<i>Neisseria</i> spp.	DC ¹	+	+	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DC	+	+	+
<i>Moraxella</i> spp.(otras)	B ³	+	+	-
<i>Kingella</i> spp.	CB ²	+	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	DC (esc B)	-	+	-

¹Diplococos; ²Cocobacilos; ³Bacilos

Tabla 2. Características diferenciales de las principales especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*

Especies	AN 35°C	AS 22°C	TM	GL U	MA L	SA C	LA C	NO 3	DN	PIG
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>N. cinerea</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-

<i>N. subflava</i>	+	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. catarrhalis</i>	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	-

AN 35°C: crecimiento en agar nutritivo a 35°C; AS 22°C: crecimiento en agar sangre o agar chocolate a 22°C; TM: crecimiento en Agar Thayer Martin; GLU: oxidación de glucosa; MAL: maltosa; SAC: sacarosa; LAC: lactosa; NO₃⁻: reducción de nitratos a nitritos; DN: DNasa; PIG: pigmento amarillo.

Moraxella catarrhalis

Son diplococos gram negativos no esporulados, oxidasa y catalasa positivos, inmóviles. Son aeróbicos y su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37°C, aunque desarrollan también a menores temperaturas (28°C). Crecen bien en agar tripteína de soja, agar sangre y en agar chocolate, como así también en medios líquidos. No producen la oxidación de azúcares en medio CTA y dan positivas las pruebas de reducción de nitratos y DNasa.

Sus colonias en agar sangre son características, porque son opacas y quedan absolutamente despegadas del agar.

Producen infecciones respiratorias en pacientes de la comunidad: exacerbaciones bronquiales en enfermos pulmonares crónicos, otitis media (tercer o cuarto germen en frecuencia), sinusitis y más raramente neumonía.

CAPÍTULO 4

Bacilos gram positivos aerobios y facultativos

No son muchas las infecciones por bacilos gram positivos aerobios o facultativos, que se producen en el hombre. Para su mejor tratamiento los vamos a clasificar en esporulados y no esporulados y a estos últimos en catalasa positivos y catalasa negativos.

Bacilos gram positivos esporulados

Si bien existen otros géneros que muy ocasionalmente pueden aislarse de materiales clínicos humanos, las especies relevantes en clínica sólo pertenecen al género *Bacillus*.

Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos que normalmente se tiñen bien como gram positivos, pero a veces pueden aparecer como gram variables o incluso como gram negativos (Figura 1). Como no siempre se ven los endosporos, cuando se sospecha que se trata de alguna especie de *Bacillus*, se debe realizar la prueba de esporulación (cuadro 1).

Cuadro 1. Prueba de esporulación

Procedimiento		
Realizar una suspensión de la bacteria en un caldo de cultivo.		
Dividir en dos tubos.		
Calentar uno de los tubos a la temperatura indicada durante el tiempo correspondiente (ver abajo).		
Colocar ambos tubos a 37°C.		
El desarrollo en ambos tubos indica esporulación.		
Alternativas	Temperatura	Tiempo
Alternativa 1	70°C	30 minutos
Alternativa 2	80°C	10 minutos
Alternativa 3 (<i>B. anthracis</i>)	62 – 65°C	15 – 20 minutos

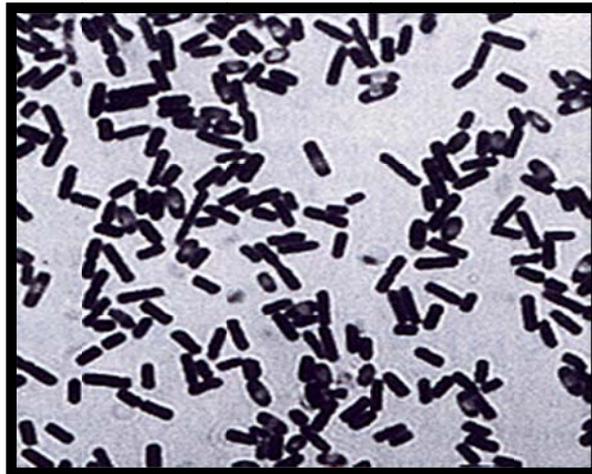


Figura 1. Bacilos gram positivos esporulados aerobios

Patogenia y espectro de infecciones

Bacillus anthracis

La mayor parte de las especies de *Bacillus* aparecen en las muestras clínicas como contaminantes ambientales. La especie más virulenta para el hombre es *Bacillus anthracis*, agente etiológico del ántrax o carbunco. Es un patógeno primario que infecta al hombre a partir de animales enfermos. La forma normal de transmisión es por contacto directo con ganado infectado o por ingesta de productos de animales contaminados. También fue utilizado como agente del bioterrorismo. Los esporos pueden vivir mucho tiempo en el suelo (más de 10 años) lo que ha representado pérdidas económicas importantes en el pasado. Es extremadamente rara la transmisión persona a persona.

Se presenta en tres formas: ántrax cutáneo, ántrax gastrointestinal y ántrax respiratorio. Las tres formas pueden conducir raramente a una meningitis como complicación.

El ántrax cutáneo consiste en lesiones papulares que aparecen a los 2 – 6 días y que luego progresan hacia úlceras y escaras necróticas. Las lesiones son indoloras y no son purulentas si no se sobreinfectan con otros microorganismos.

El ántrax gastrointestinal se origina por ingesta de los esporos provenientes de carne poco cocida. Si afecta la mucosa orofaríngea es más fácilmente sospechada y el paciente puede recibir el tratamiento adecuado. Si no se cuenta con un antecedente de contacto previo con animales infectados la enfermedad es reconocida más tardíamente y por lo tanto es más grave. Los signos y síntomas son muy inespecíficos: náuseas, vómitos, anorexia, dolor abdominal, diarrea y fiebre.

El ántrax respiratorio es frecuentemente fatal. Comienza con un cuadro gripal (malestar general, fiebre, mialgias, tos no productiva) que aparentemente mejora, pero que luego desencadena un cuadro de dificultad respiratoria grave, que lleva a la muerte en pocas horas.

Además de la cápsula antifagocitaria, *B. anthracis* presenta un plásmido de virulencia pXO1 en el que están localizados los genes que codifican para las toxinas LeTx (toxina letal), EdTx (factor de edema) y PA (componente de unión y translocación de ambas toxinas).

Bacillus cereus

Bacillus cereus es un patógeno oportunista del hombre y de algunos animales y una causa importante de toxiinfección alimentaria.

Como patógeno de origen alimentario, puede producir dos tipos de cuadros clínicos: un síndrome diarreico con dolor abdominal que se produce entre las 8 y las 16 horas de la ingestión de comida contaminada y el síndrome emético, caracterizado por náuseas y vómitos entre 1 y 5 horas después de la ingesta. Las toxinas implicadas son la hemolisina BL, la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K.

B. cereus es un importante patógeno ocular que produce endoftalmitis de difícil tratamiento. Estas infecciones se producen generalmente por trauma ocular, aunque también pueden ocurrir por vía hematogena o luego de una cirugía. También puede producir queratitis asociada a lentes de contacto.

Microorganismos de esa y otras especies de *Bacillus*, fueron descritas como agentes etiológicos de infecciones en pacientes inmunodeprimidos pero en muy contados casos. Otro tipo de infecciones oportunistas (infecciones de heridas, fracturas expuestas, quemaduras, entre otras) son muy raras pero también fueron observadas.

Identificación a nivel de especie

La mayoría de las especies son catalasa positivas y presentan movilidad por medio de flagelos peritricos.

Para su identificación a nivel de especie es necesario documentar el tipo de hemólisis y realizar pruebas metabólicas.

En el examen directo es difícil ver la cápsula de *B. anthracis*, pero sí puede observarse con las tinciones adecuadas. Las colonias de *B. anthracis* en agar sangre ovina son grandes, planas, de color gris, con bordes irregulares y proyecciones arremolinadas (como cabeza de medusa) **no hemolíticas**.

Las colonias de otras especies son también grandes, pero en casi todos los casos son **beta-hemolíticas**.

Los métodos moleculares pueden dar resultados erróneos si no se los utiliza junto con pruebas convencionales y/o serológicas. Si bien existe una gran homología genética intraespecie, también hay similitud en las secuencias de los genes 16S y 23S rRNA de *B. anthracis* y *B. cereus*.

Tabla 1. Identificación presuntiva de microorganismos del género *Bacillus*

Especies	Lecitinasa	V P	Movilidad	PEN	Nitratos
<i>B. anthracis</i>	+	+	-	S	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	R	(+)
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	R	+
<i>B. mycoides</i>	+	+	-	R	(+)
Otras	-	v	+	ND	v

VP = Voges-Proskauer; S = sensibilidad; R = resistencia; v = variable; ND = no se dispone de datos suficientes; (+) positivo lento.

Sensibilidad a los antibióticos

B. anthracis permanece sensible a la penicilina, aunque algunas cepas destinadas al bioterrorismo han sido manipuladas genéticamente para convertirlas en resistentes. Las tetraciclinas, el cloranfenicol y las fluoroquinolonas pueden utilizarse en pacientes alérgicos a los beta-lactámicos.

B. cereus y *B. thuringiensis* producen una beta-lactamasa de amplio espectro, que les proporciona resistencia a las penicilinas y cefalosporinas. Por ello se utilizan para el tratamiento de sus infecciones, imipenem, cloranfenicol, vancomicina, ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina, aunque con algunos de ellos se registraron casos de fallas terapéuticas.

Bacilos gram positivos no esporulados

Las pruebas de primera línea son la coloración de Gram, el lipofilismo, la catalasa, la producción de pigmento y la hemólisis. Las pruebas iniciales y las especies que dan positiva y negativa la prueba de catalasa se encuentran listadas en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación según la prueba de catalasa

Catalasa positivos	Catalasa negativos
<i>Corynebacterium</i> y géneros relacionados	<i>Lactobacillus</i>
<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>
<i>Kurthia</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Gardnerella</i>
<i>Rhodococcus</i>	<i>Actinobaculum</i>

Bacilos gram positivos no esporulados, catalasa negativos

Actinomyces

Si bien hay especies aerotolerantes de *Actinomyces*, éstos son bacilos gram positivos no esporulados anaerobios. En la coloración de Gram se presentan como formas bacilares filamentosas **ramificadas**. Su importancia clínica está dada por la actinomicosis pulmonar, los cálculos de las glándulas salivales y las infecciones crónicas de cabeza y cuello. A diferencia de *Nocardia* no son ácido resistentes, con la coloración de Kinyoun.

Arcanobacterium

Son bacilos gram positivos, catalasa negativos, fermentadores, no móviles. Contiene 9 especies, de las cuales sólo 3 fueron aisladas de materiales clínicos humanos: *Arcanobacterium haemolyticum*, *Arcanobacterium pyogenes* y *A. bernardiae*.

A. haemolyticum se aísla con más frecuencia de exudados faríngeos humanos que de secreciones de heridas, *A. bernardiae* de abscesos subcutáneos y *A. pyogenes* de mucosas de animales.

Las tres especies son correctamente identificadas por el sistema API Coryne.

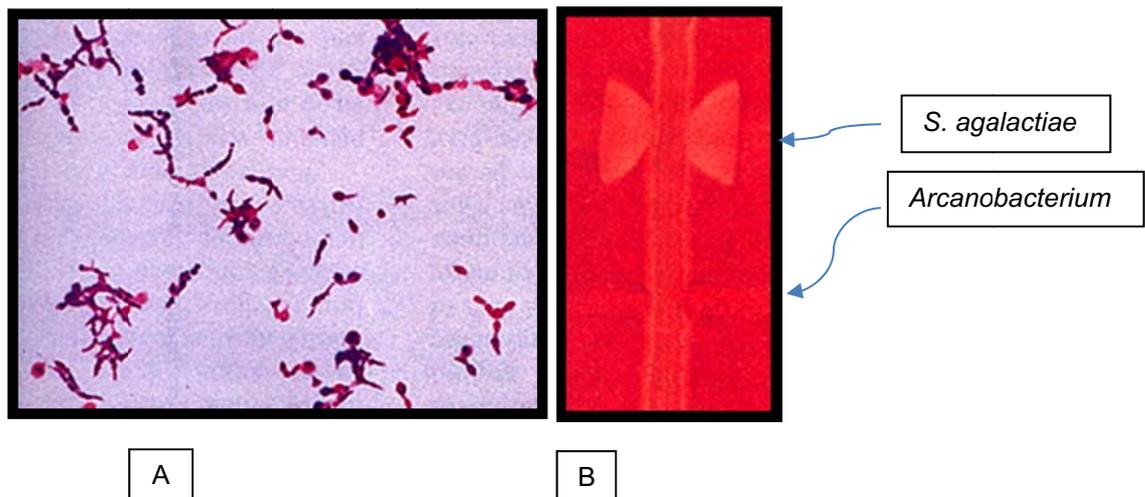


Figura 2. (A) Coloración de Gram de un cultivo de *Arcanobacterium haemolyticum*, (B) Prueba de CAMP invertida. Nótese la inhibición de la hemólisis tenue producida por la beta-lisina del estafilococo en la proximidad de la estria de *A. haemolyticum*. En comparación se realizó la prueba de CAMP con una cepa de *Streptococcus agalactiae*.

La coloración de Gram muestra formas bacilares agrupadas en forma de Y con esbozos de ramificación (Fig. 2A). Las colonias de *Arcanobacterium haemolyticum* son pequeñas (0,5 mm a las 48 h), rugosas (de materiales respiratorios) o lisas (de otros materiales, especialmente de heridas). Por la producción de fosfolipasa D en lugar de reforzar la hemólisis tenue de la beta-lisina de *Staphylococcus aureus*, la inhiben en la reacción de CAMP (CAMP invertida, Fig. 2B). Produce una beta-hemólisis más evidente en agar sangre, preparado con sangre humana que en el que contiene sangre ovina.

A. bernardiae forma colonias pequeñas pegajosas o cremosas. Fermenta glucógeno y fermenta más rápidamente la maltosa que la glucosa.

Las colonias de *A. pyogenes* son algo más grandes (1 mm a las 48h) y beta-hemolíticas. Da positivas las pruebas de beta-glucuronidasa y xilosa.

Gardnerella vaginalis

G. vaginalis puede encontrarse entre la microbiota habitual de la zona anorrectal de niños y adultos de ambos sexos. También es parte de la microbiota del tracto urogenital femenino y, junto a un grupo de microorganismos aerobios y anaerobios, es responsable de la llamada vaginosis bacteriana (ver Parte IV, Capítulo 12).

Es la única especie del género. Son bacilos que toman en forma variable la coloración de Gram, son inmóviles y tienen un metabolismo fermentativo lento. Producen una hemólisis tenue en agar sangre humana, que puede visualizarse mejor si a una placa de agar BHI o agar Mueller Hinton se la recubre con una capa fina de agar sangre humana. La hemólisis es más evidente a las 48 h de incubación. Da positiva las prueba de alfa-glucosidasa, hidroliza el almidón y, en un 90% de los casos, también al hipurato. Es inhibida por discos de metronidazol (50 µg), trimetoprima (5 µg) pero no por los de sulfamida (1 mg).

Lactobacillus

Se trata de bacterias pertenecientes a la microbiota habitual del intestino

humano y del tracto genital femenino. Excepcionalmente, en pacientes especiales, puede llegar a producir casos de bacteriemia y/o endocarditis. Son bacilos largos, de tinción regular (Fig.3). Pueden desarrollar en agar chocolate como colonias puntuales en condiciones de microaerobiosis.

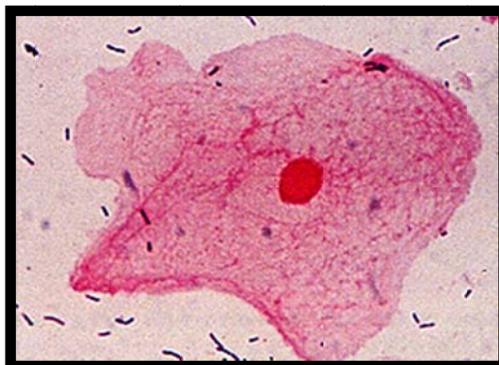


Figura 3. Célula de la mucosa vaginal normal con presencia de lactobacilos.

Erysipelothrix

La única especie patógena para el hombre es *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Es agente colonizante e infectante de diversos animales, especialmente del cerdo. A partir de exposición a los mismos se producen las infecciones, que pueden ser localizadas (erisipeloide) o invasivas (endocarditis principalmente).

El erisipeloide es una celulitis localizada que aparece en el sitio de inoculación a los 2 - 7 días de incubación. Pueden aparecer vesículas y linfangitis regional, fiebre y artralgias.

Los factores de virulencia principales son la cápsula polisacárida y la neuraminidasa.

Las colonias son muy pequeñas, alfa-hemolíticas y pueden tardar hasta 3 días en aparecer en las placas de agar sangre (Fig. 4A). Hay dos tipos de colonias: lisas y rugosas. El principal rasgo distintivo es la producción de ácido sulfhídrico en el TSI (Fig. 4B).

Da negativas las pruebas de nitratos, ureasa, esculina, gelatina y de varios azúcares, pero da positivas las pruebas de glucosa y lactosa.

Los antibióticos de elección son ampicilina y penicilina. Esta bacteria es intrínsecamente resistente a la vancomicina.

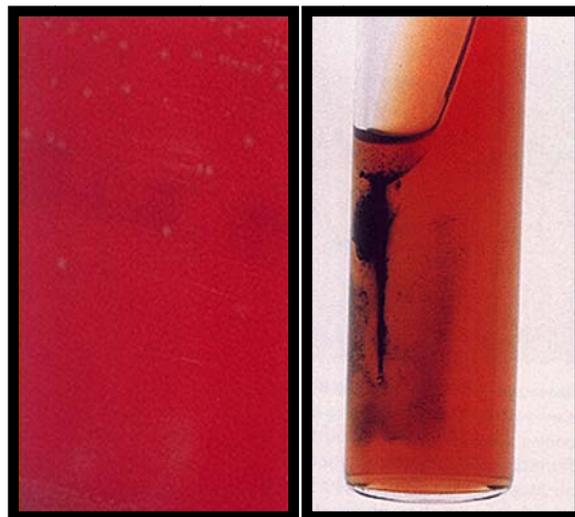


Figura 4. A. Colonias alfa-hemolíticas de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. B. Producción de SH₂ en el TSI.

Bacilos gram positivos no esporulados, catalasa positivos

Listeria

Dos especies son patógenas para el hombre: *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*. Por su frecuencia e importancia se focalizará la atención sobre *L. monocytogenes*.

Son bacilos gram positivos cortos que pueden confundirse con bacilos difteromorfos. Son de vida saprófita en el ambiente pero pueden causar enfermedades en animales o simplemente colonizarlos. A partir de allí pueden contaminarse los alimentos y llegar al hombre. La carne, los vegetales, la leche cruda, el queso, entre otros, son productos que pueden estar contaminados con *Listeria*. Se calcula que entre un 1% y un 5% de los intestinos humanos están colonizados por *L. monocytogenes*.

La mayor parte de las listeriosis ocurren en pacientes inmunocomprometidos mayores de 60 años. En el recién nacido es importante su participación en la sepsis temprana y tardía.

También puede causar gastroenteritis ligada a brotes producidos por alimentos contaminados.

Sus principales factores de virulencia son las internalinas A y B y la listeriolisina que es una hemolisina.

Las colonias crecen bien a las 48 horas en agar sangre ovina en atmósfera con 5% de CO₂ en donde producen una beta-hemólisis muy tenue, como la de *S. agalactiae*. La hemólisis, la catalasa (+), la prueba de CAMP (+), la hidrólisis del hipurato (+) y la movilidad característica (a los tumbos o pendular, +) son pruebas clave para reconocer el género y la especie. El tratamiento de elección es la combinación de ampicilina o amoxicilina con gentamicina. *L. monocytogenes* es intrínsecamente resistente a las cefalosporinas.

***Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas**

Los bacilos gram positivos similares a *Corynebacterium diphtheriae* han sido llamados en forma genérica "bacilos difteromorfos o coryneformes". Son aeróbicos, no esporulados, catalasa positivos de forma irregular y ni siquiera parcialmente ácido-resistentes.

Comprenden especies de *Corynebacterium*, *Actinobaculum* (raros patógenos urinarios), *Turicella* (agente de otitis media aguda), *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Rothia*, *Oerskovia* y otros géneros menos frecuentes.

El género *Corynebacterium* comprende al menos 81 especies, 50 de las cuales tienen interés clínico. En la coloración de Gram se los ve como bacilos ligeramente curvos, que pueden disponerse en pares, en V, en empalizada y en forma de letras chinas.

Muchas especies son parte de la microbiota habitual de la piel y de las mucosas humanas y de mamíferos. La mayoría de las especies son ambientales. *Corynebacterium diphtheriae* tiene como reservorio la piel y la nasofaringe, desde donde se propaga a otros sitios para producir la difteria en calidad de patógeno primario. La mayor parte de las otras especies son oportunistas y muchas veces aparecen en los materiales clínicos como contaminantes. Por ello sólo se deben

jerarquizar cuando se los ve en el examen directo del material clínico junto con leucocitos, cuando se los aísla en varias muestras del mismo paciente, cuando se los aísla de sitios previamente estériles (por ejemplo, líquidos de punción) o en concentraciones $\geq 10^4$ ufc/ml de muestras de orina, si no se aíslan otros gérmenes en forma concomitante.

La difteria es una enfermedad producida principalmente por *C. diphtheriae*, aunque también puede producirla *Corynebacterium ulcerans*. Gracias a los programas de vacunación es una enfermedad en franca desaparición en la mayor parte del planeta. Sin embargo, se mantiene en forma endémica en algunas poblaciones aborígenes y a principios de los noventa desató un brote epidémico en los países de la antigua Unión Soviética. Esporádicamente se registran casos puntuales en individuos no vacunados, como en España, en 2015. Este mismo año se registró un brote de difteria de 13 casos, pero con 3 fallecidos en Vietnam.

Se caracteriza por la aparición de una pseudomembrana adherente en la nasofaringe, que puede provocar la obstrucción de la vía aérea, inflamación de las fauces, disfagia, linfadenitis, fiebre baja, malestar general y cefaleas. La liberación de una potente exotoxina, codificada por un bacteriófago portador del gen *tox*, puede provocar miocarditis, neuritis y daño renal.

Cepas toxigénicas y más comúnmente, no toxigénicas pueden producir infecciones cutáneas y endocarditis. La capacidad de producir la toxina diftérica se comprueba mediante la prueba de Elek (Fig. 5)

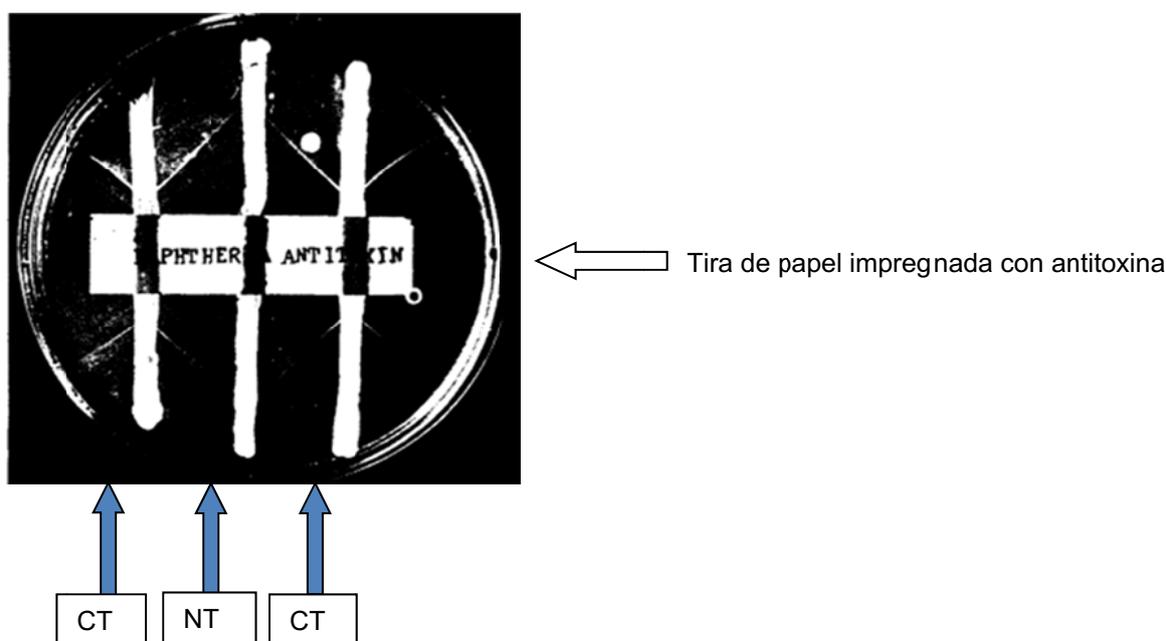


Figura 5. Prueba de Elek para determinar la presencia de toxina diftérica. Consiste en incluir una tira de papel de filtro impregnado con antitoxina diftérica en una placa de agar nutritivo. Dejar solidificar. Cruzar estrías de cepas toxigénicas y no toxigénicas conocidas (controles positivo y negativo) además de la cepa problema. Dejar incubar y observar la presencia de bandas de precipitación a 45° de la tira. (Foto original de 1949, reproduced with permission from BMJ & Association of Clinical Pathologists. Elek SD. The Plate virulence test for diphtheria. J Clin Pathol. 1949; 2: 250–258). CT: cepa toxigénica. NT: cepa no toxigénica.

Del resto de las especies que producen infecciones oportunistas destacamos a *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum* y *Corynebacterium urealyticum*.

C. jeikeium se encuentra con frecuencia en materiales clínicos y puede transmitirse horizontalmente dentro de los hospitales. Produce bacteriemia con o sin endocarditis e infecciones de heridas.

C. minutissimum, *C. striatum* y *C. amycolatum* son agentes etiológicos de infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones respiratorias y del tracto urinario.

C. urealyticum es agente de infecciones urinarias complicadas con formación de cálculos vesicales de estruvita [PO₄(NH₄)Mg]. Raramente producen bacteriemia.

La identificación de las especies más frecuentes puede hacerse por el sistema API Coryne en un 90% de los casos. Esquemas manuales orientadores pueden obtenerse aplicando las tablas 3, 4 y 5.

Una de las pruebas básicas es la determinación del lipofilismo. Se considera que un microorganismo es lipofílico cuando es estimulado en su desarrollo por Tween 80 al 0,1 – 1%. Estas bacterias crecen como colonias puntiformes recién a las 48-72h en agar sangre (Fig. 6).



Figura 6. Desarrollo en agar sangre de una bacteria lipofílica (derecha) y una no lipofílica (izquierda)

Tabla 3. Clasificación según pigmento

Amarillo	Anaranjado-rojo	Rosado	Tostado	Negro
<i>Oerskovia</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. nigricans</i>
<i>Exiguobacterium</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>		<i>C. striatum</i>	
<i>Cellulomonas</i>			<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	
<i>Lefsonia</i>			<i>C. xerosis</i>	
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i>			
<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>			
<i>Aureobacterium</i>				

Tabla 4. Identificación presuntiva de los bacilos gram positivos no esporulados aerobios más frecuentes en clínica humana

Género	Cat	O/F	Mov	Nit	U	Esc	Glu	Mal	Sac	Mnl	Xil
<i>Turicella</i>	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rothia</i>	V	F	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Oerskovia</i>	+	F	v	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Arcanobacterium</i>	-	F	-	-	-	V	+	v	v	v	v
<i>Gardnerella</i>	-	F	-	-	-	-	+	+	v	-	-
<i>Corynebacterium</i>	+	v	-	v	V	-	+	v	v	-	-

Cat: catalasa; O/F : oxidación (O) y fermentación (F); Mov: movilidad; Nit: reducción de nitratos a nitritos; U: ureasa; Esc: hidrólisis de esculina; Glu: glucosa, Mal: maltosa; Sac: sacarosa; Mnl: manitol; Xil: xilosa.

Tabla 5. Identificación presuntiva de las especies de *Corynebacterium* spp. más frecuentes en clínica humana

Especie	O/F	Lip	Nit	U	Esc	PYA	Glu	Mal	Sac	Mnl	Xil	C
<i>C. amycolatum</i>	F	-	v	v	-	+	+	v	v	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i>	F	v	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. jeikeium</i>	O	+	-	-	-	+	+	+	v	-	-	-
<i>C. striatum</i>	F	-	+	-	-	+	+	-	v	-	-	v
<i>C. ulcerans</i>	F	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	R
<i>C. urealyticum</i>	O	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

O/F : oxidación (O) y fermentación (F); Lip: lipofilismo; Nit: reducción de nitratos a nitritos; U: ureasa; Esc: hidrólisis de esculina; Glu: glucosa, Mal: maltosa; Sac: sacarosa; Mnl: manitol; Xil: xilosa; C: factor CAMP; R: inhibición del factor CAMP.

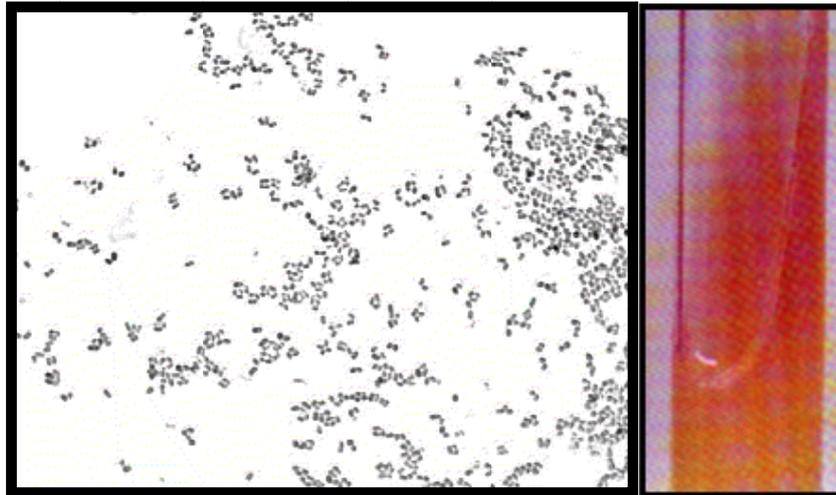


Figura 7. (A) Coloración de Gram de un cultivo de *Corynebacterium urealyticum*. Véanse las formas cocoides con la disposición típica en empalizada y dedos de guante. (B) Prueba de la ureasa de Christensen: esta bacteria la da positiva en término de unos pocos minutos.

***Nocardia* spp.**

Las bacterias de este género son habitantes del suelo y del agua. El hombre se infecta por inhalación (neumonía) o por penetración a través de escoriaciones de la piel (nocardiosis cutánea). Se trata de infecciones por lo general crónicas y que afectan principalmente a individuos inmunocomprometidos. La especie más frecuente es *Nocardia asteroides* aunque hay otras especies que pueden producir estas infecciones.

La coloración de Gram es orientadora ya que bacilos ramificados, delgados, gram positivos inducen a realizar la coloración de Kinyoun que revelará la presencia de filamentos ramificados ácido-resistentes (Fig.14 A). Pueden desarrollar en medios comunes, como agar sangre, agar chocolate, agar Sabouraud sin cloranfenicol y en medios para micobacterias, adoptando distintas formas y pigmentación.

***Rhodococcus* spp.**

Son microorganismos ambientales que ingresan al organismo humano por inhalación. *Rhodococcus equi* se ha asociado principalmente a neumonías en pacientes VIH positivos. Es intracelular facultativo y puede reproducirse dentro de los macrófagos. En la coloración de Gram aparecen como formas cocáceas y a veces con tendencia a perder la coloración violeta. Son parcialmente ácido-resistentes. En agar sangre desarrollan en forma de colonias rosadas. Para su identificación puede usarse el api Coryne (Biomérieux Argentina) o pruebas manuales utilizadas para la identificación de las distintas especies de *Corynebacterium*. Son ureasa positivos.

CAPÍTULO 5

Micobacterias

Si bien muchas de las especies del género *Mycobacterium* no se tiñen con la coloración de Gram, presentan una pared celular propia de los bacilos gram positivos. La presencia en esta pared de ácido N-glicolilmurámico, en lugar del N-acetilmurámico y el contenido elevado de lípidos, hacen que estas bacterias no se tiñan fácilmente con colorantes de anilina, como los del Gram y, a su vez, cuando toman la coloración (por ejemplo, con fucsina en caliente), sean difíciles de decolorar. Ni siquiera se decoloran con una mezcla de alcohol y ácido clorhídrico, y de aquí es que se los denomine bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

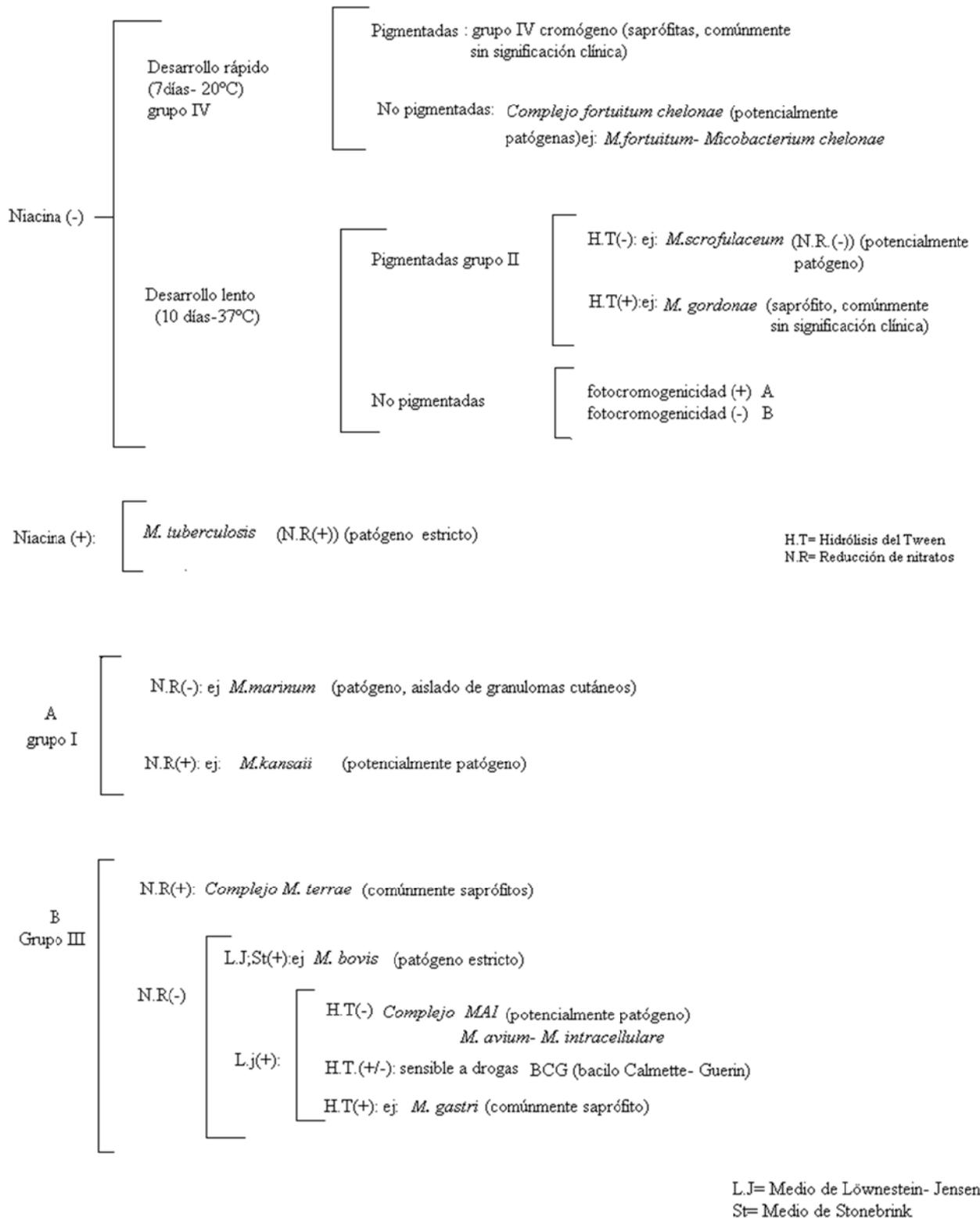
Desarrollan muy lentamente en los medios de cultivo, y en la mayoría de los casos es necesaria la utilización de medios especiales (ver más adelante el capítulo 2 de la Parte IV: Investigación del bacilo de Koch)

En la actualidad hay más de 70 especies conocidas de micobacterias, pero se destaca el complejo *Mycobacterium tuberculosis* como el grupo de mayor impacto en clínica humana.

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* está conformado por *Mycobacterium tuberculosis* propiamente dicho, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. El resto se conoce como micobacterias no tuberculosas o atípicas. Los métodos empleados para su aislamiento e identificación se detallan en la Parte IV, capítulo 3 y las coloraciones, medios de cultivo y pruebas bioquímicas se detallan en los apéndices I, II y III.

La clasificación del cuadro 1 se realizó en base a la velocidad de crecimiento (de crecimiento rápido y de crecimiento lento) y a la capacidad de desarrollar pigmento en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas).

Cuadro 1. Esquema básico para identificación de micobacterias



Para la determinación de la producción de pigmento se incuba un caldo de cultivo (por ejemplo, 7H9) durante 5-7 días. Se ajusta la concentración para lograr una turbiedad equivalente a la del estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se diluye 1:10⁴ y se siembra 0,1 ml de ese caldo diluido en tres tubos de medio Löwenstein- Jensen. Dos de los tubos se envuelven con papel de aluminio para impedir el acceso de la luz y los tres se incuban a 35°C en estufa (si el microorganismo proviene de una lesión de piel se agregan tubos que se incuban a 30°C). Los cultivos se controlan a los 5-7 días para observar la presencia de colonias. Se vuelve a controlar cada 3 días.

Los microorganismos de crecimiento rápido producen colonias visibles en menos de 7 días.

Cuando se observan colonias bien desarrolladas, uno de los tubos envueltos se expone a una luz brillante por espacio de 2 horas con la tapa suelta. El tubo luego se envuelve y se lo coloca nuevamente en la estufa. Después de 24, 48 y 72 horas desde la exposición a la luz, se examinan los tubos para observar la producción de pigmento.

Los resultados posibles son los de la tabla 1.

Tabla 1. Resultados esperables en la prueba de producción de pigmento

Clasificación según pigmento	Clasificación según velocidad de crecimiento	Colonias antes de los 7 días	Pigmento en el tubo no expuesto a la luz	Pigmento en el tubo expuesto a la luz
Fotocromógenas	rápido	Sí	No	Sí
	lento	No	No	Sí
Escotocromógenas	rápido	Sí	Sí	Sí
	lento	No	Sí	Sí
No cromógenas	rápido	Sí	No	No
	lento	No	No	No

CAPÍTULO 6

Micoplasmas, clamidias y rickettsias

Micoplasmas

Los micoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes, familia *Mycoplasmataceae*. Esta familia comprende dos géneros: *Ureaplasma* y *Mycoplasma*.

Se caracterizan por ser bacterias muy pequeñas (alrededor de 0,5 µm) que carecen de pared celular y que, por poseer un genoma muy pequeño, tienen importantes requerimientos nutricionales. No obstante, son capaces de desarrollar en medios artificiales (por ejemplo, PPLO) en condiciones aeróbicas. Por no poseer pared celular, no se tiñen con las coloraciones habituales (por ejemplo, Gram).

Hay varias especies que pertenecen a la microbiota habitual de las mucosas humanas, pero hay otras que producen infecciones en el hombre (Cuadro 1).

Micoplasmas genitales

Tanto *Mycoplasma hominis* como *Ureaplasma urealyticum* forman parte de la microbiota del tracto genital femenino hasta en más de un 50% de mujeres asintomáticas. En porcentajes mucho menores se los encuentra en la uretra masculina. Tanto *M. hominis* como *U. urealyticum*, han sido caracterizados como agentes de corioamnionitis, salpingitis, endometritis posparto, infecciones extragenitales y se los ha visto asociados con otros microorganismos en la vaginosis bacteriana, aunque su relevancia en este campo permanece aún en discusión. *M. hominis* es productor de enfermedad inflamatoria pélvica, mientras que *U. urealyticum* es agente de uretritis en el varón, aborto espontáneo, y puede desencadenar el parto prematuro de niños de bajo peso. *Mycoplasma genitalium*, por su parte ha sido caracterizado como agente de uretritis en el varón, cervicitis y enfermedad inflamatoria pélvica en la mujer

Cuadro 1. Micoplasmas de interés en medicina humana

Especies	Infecciones más frecuentes
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonía adquirida en la comunidad Infecciones respiratorias altas

	Infecciones o complicaciones extrarrespiratorias, especialmente del sistema nervioso central
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Meningitis y neumonía en neonatos Infecciones en inmunocomprometidos Uretritis no gonocócica Otras infecciones genitales
<i>Mycoplasma hominis</i>	Infecciones del tracto genital femenino
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Infecciones del tracto genital
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Infecciones del tracto genital en pacientes HIV+
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Infecciones del tracto genital en pacientes HIV+

Mycoplasma pneumoniae

Los micoplasmas son esencialmente patógenos de las mucosas que viven parasitando las células epiteliales, que en el caso de *Mycoplasma pneumoniae* corresponden al tracto respiratorio. Si bien se trata de un patógeno eminentemente extracelular, su supervivencia depende de una asociación íntima con las células del huésped. Se lo ha descrito como causante de diversas patologías, pero la más frecuente es la **neumonía de la comunidad**, en la que puede asociarse a otros patógenos. Si bien en algunos casos se trata de procesos autolimitados, muchas veces requieren hospitalización y en ese sentido, es particularmente relevante la neumonía en pacientes inmunocomprometidos, donde se han reportado casos fulminantes. Aproximadamente un 25 % de individuos infectados con *M. pneumoniae* pueden presentar complicaciones extrapulmonares a diferentes tiempos respecto al comienzo de los síntomas respiratorios e incluso en ausencia de ellos. Si bien muchos de estos casos se deben a reacciones de autoinmunidad, el uso de métodos moleculares demostró al menos la presencia de material genético de estos microorganismos en diversos tejidos y líquidos biológicos. Las complicaciones del sistema nervioso central han sido reconocidas como las manifestaciones extrapulmonares más frecuentes producidas por *M. pneumoniae*. Tales complicaciones incluyeron encefalitis, síndrome cerebelar y polirradiculitis, parálisis de los nervios craneales, meningoencefalitis, encefalomielitis diseminada aguda, entre otros.

Dentro de los métodos diagnósticos, el cultivo tiene 100% de especificidad, pero es lento y los requerimientos de esta bacteria hacen que su sensibilidad sea extremadamente baja (<60%). No obstante, la recuperación del microorganismo es esencial para realizar estudios epidemiológicos y de sensibilidad antibiótica. La detección de antígenos también es poco sensible e incluso produce reacciones cruzadas. Los métodos moleculares son rápidos, altamente específicos y sensibles, pero en ciertas instancias no son capaces de diferenciar colonización de infección. Por último, los métodos serológicos presentan el problema de su uso en pacientes inmunodeprimidos, que a veces no pueden

generar una respuesta inmunológica medible. En adultos, la exposición repetida puede anular la respuesta inmune generando resultados falsamente negativos. También los métodos serológicos tienen el inconveniente de requerir de muestras en fases aguda y convaleciente, de poco valor para el manejo del paciente y difíciles de obtener. No obstante, algunos de los nuevos métodos han progresado en algunos de estos aspectos y la determinación de IgM en pediatría tiene una buena correlación con la infección aguda por *M. pneumoniae*. Una aproximación lógica es incorporar tanto estudios de PCR como serológicos (IgM e IgG), para lograr un diagnóstico óptimo.

Diagnóstico microbiológico

M. pneumoniae, *M. hominis* y *U. urealyticum* pueden aislarse por cultivo en medio PPLO adicionado de glucosa, arginina o urea respectivamente. No obstante, por la baja sensibilidad de los cultivos y por la demora en obtener los resultados, actualmente se prefieren los métodos moleculares (PCR), especialmente para *M. pneumoniae*. Para ello se utilizan secreciones respiratorias o hisopados faríngeos.

Los métodos serológicos (detección de anticuerpos en sangre) son efectivos, pero pueden arrojar resultados falsamente positivos y negativos por diversas causas, especialmente en adultos. Un resultado positivo confiable surge cuando se dispone de sueros en fase aguda de la enfermedad y en el período de convalecencia. Por diferencias en el análisis cuantitativo de anticuerpos, se puede determinar la conversión serológica (de negativo a positivo) o la cuadruplicación de título. No obstante, esto da un resultado diferido, de interés epidemiológico, pero de escaso o nulo valor clínico.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

Los micoplasmas, por carecer de pared celular, son naturalmente resistentes a las penicilinas y a los glucopéptidos. Los antibióticos de elección para su tratamiento son las tetraciclinas, los macrólidos y las nuevas fluoroquinolonas. Se han descrito algunos aislamientos resistentes a macrólidos.

Clamidias

Las clamidias son bacterias intracelulares obligadas, que presentan un ciclo de vida bifásico, con dos formas funcional y metabólicamente diferentes: cuerpos elementales, infectantes y pequeños (aproximadamente 0,6 μm), incapaces de dividirse y cuerpos reticulados, no infectantes, metabólicamente activos y con capacidad de multiplicarse (Fig. 1).

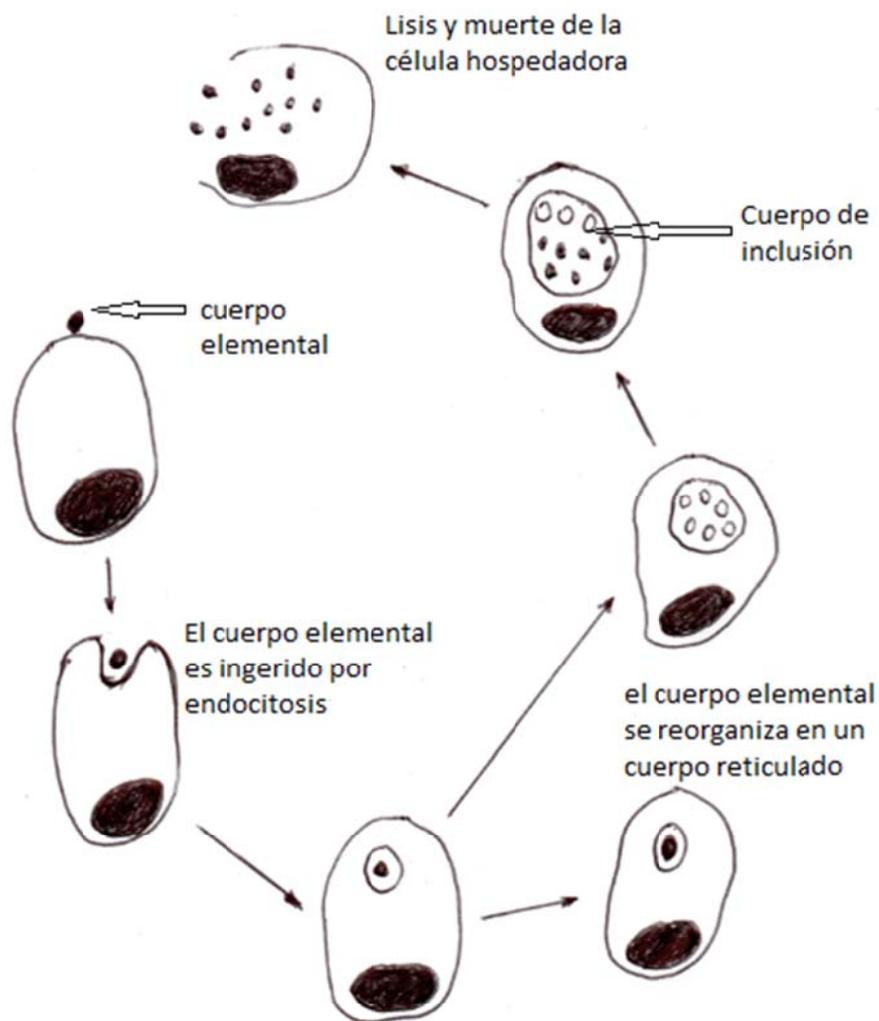


Figura 1. Ciclo de las clamidias.

Si bien actualmente se han descrito varias especies relacionadas, pertenecientes a otros géneros, las tres más importantes en patología infecciosa humana son *Chlamydia trachomatis* (19 serovariedades), *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* y *Chlamydia (Chlamydophila) psittaci* (6 serovariedades).

Chlamydia pneumoniae

Parece ser un patógeno exclusivamente humano. Se transmite por vía respiratoria, a partir de microgotas. Se la ha asociado con neumonía (similar a la producida por *M. pneumoniae*), faringitis, sinusitis y cuadros gripales. Si bien los cuadros son generalmente leves, en ancianos, inmunocomprometidos y pulmonares crónicos, la infección puede ser grave.

Se ha sugerido también su rol en la patología cardiovascular (aterosclerosis), por habérsela hallado en las placas ateromatosas. No obstante, la causalidad no ha sido comprobada.

Métodos serológicos y moleculares han sido empleados para su diagnóstico. El cultivo en líneas celulares, como sucede con otras clamidias, resulta engorroso y tardío. Para el tratamiento se utilizan tetraciclinas o eritromicina.

Chlamydia psittaci

Chlamydia (Chlamydophila) psittaci es el agente causal de una zoonosis llamada psitacosis, que fue descrita por primera vez en Suiza en la década de 1870. Hubo brotes dispersos en Europa y en EEUU, pero la gran pandemia ocurrió en julio de 1929, con aproximadamente 800 casos humanos. La enfermedad comenzó en Argentina y se extendió a Europa y Norteamérica, por el tráfico de pájaros exóticos. Los casos fueron agudos y con altas tasas de mortalidad. Las clamidias fueron detectadas en secreciones de pájaros infectados y en humanos en 1930. Los psitácidos: loros, cotorras, etc. no son los únicos reservorios de las clamidias, sino que también pueden colonizar o infectar otras especies de aves como palomas, patos y pavos, e incluso algunos mamíferos.

La psitacosis es una enfermedad de denuncia obligatoria que requiere un diagnóstico rápido para erradicar la fuente y prevenir nuevos casos. Los síntomas clínicos más frecuentes son fiebre alta, cefalea, mialgia, tos seca y dificultad respiratoria. Raramente se han detectado cuadros más graves que condujeron a falla multiorgánica y muerte.

El ciclo de infección comienza con la exposición del individuo a heces, orina, secreciones o vísceras de animales infectados (aves y mamíferos como reservorios). Los aerosoles ingresan por vía respiratoria y las bacterias son capturadas por las células del sistema retículo endotelial. Pasan a sangre y pulmón, dónde se producen daños en el parénquima. Además se pueden afectar otros órganos según la capacidad inmune del paciente y la virulencia de la cepa.

Pueden presentarse casos aislados o brotes. Los métodos de diagnóstico microbiológicos son:

a. El aislamiento de la bacteria es por cultivo, a partir de muestras respiratorias (esputo, líquido pleural) y sangre coagulada, tomadas en el período agudo de la enfermedad y antes del tratamiento antibiótico. Se utiliza cultivo celular, donde se observa el efecto citopático por inmunofluorescencia (IFI), con anticuerpos monoclonales. La limitación del cultivo es el requerimiento de bioseguridad de nivel III y su desventaja es la devolución tardía del resultado (al menos una semana).

b. La detección del genoma mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

c. Los métodos indirectos, siguen siendo utilizados. Detectan anticuerpos totales en pares de sueros. El primero tomado en el período agudo (desde el día 7 hasta el 14), y el segundo en el período convaleciente (desde el día 15 hasta el 21). Esto permite determinar la conversión serológica (negativo a positivo) o la cuadruplicación de título.

Para el tratamiento de los casos humanos se utilizan preferentemente tetraciclinas o eritromicina.

Chlamydia trachomatis

Las infecciones por *C. trachomatis* afectan principalmente a jóvenes sexualmente activos. Los factores de riesgo más importantes son la falta de uso de preservativos y el contacto sexual con parejas múltiples. La mayoría de estas infecciones son asintomáticas y pueden conducir a complicaciones graves, especialmente en mujeres jóvenes.

Se calcula que una de cada 15 mujeres sexualmente activas de 14 a 19 años tiene infección por clamidia. Una infección por clamidia no tratada puede aumentar el riesgo de contraer o transmitir el VIH, producir complicaciones graves y esterilidad en la mujer. En el hombre puede complicarse con epididimitis.

En las mujeres embarazadas, la infección por clamidia no tratada ha sido asociada con partos prematuros y puede transmitirse al recién nacido, causándole conjuntivitis o neumonía. Es el agente más frecuente de la **uretritis no gonocócica** en el varón y la principal causa de **enfermedad inflamatoria pelviana** en la mujer. Su nombre se asocia a que es el agente del **tracoma ocular**, enfermedad que afecta a casi 500 millones de personas en el mundo y que puede conducir a la ceguera. También algunos serotipos son los responsables del **linfogranuloma venéreo**.

El linfogranuloma venéreo es una enfermedad de transmisión sexual que se da mayormente en países de África, Asia, norte y centro de América del Sur. Se caracteriza por la aparición de una lesión genital pequeña, que dura poco tiempo y puede pasar desapercibida. Luego, los ganglios linfáticos inguinales aumentan de tamaño y forman una gran zona de tumefacción inguinal. Puede desarrollarse luego, sobre todo en mujeres, una tercera etapa, crónica, caracterizada por la hiperplasia genital, formación de fístulas, etc.

Chlamydia trachomatis es una bacteria defectiva, intracelular obligada, que infecta solamente a humanos (excepto un biotipo que causa neumonitis murina).

El reservorio parece ser el hombre o la mujer, que padezcan infecciones crónicas, asintomáticas o persistentes.

Se encuentran específicamente en seres humanos y se dividen en 19 serovariedades, en virtud de las diferencias que presenta su proteína principal de membrana externa (MOMP).

La uretritis no gonocócica y la enfermedad inflamatoria pelviana son enfermedades de transmisión sexual. Las infecciones causadas por *C. trachomatis* se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Infecciones producidas por las distintas serovariedades de *Chlamydia trachomatis*

Serovariedades	Infección	Vías de transmisión
A, B, Ba, C	Tracoma endémico	De manos a ojos, por fomites ¹ , por moscas
L1, L2, L2b, L3	Linfogranuloma venéreo	Contacto sexual
D, E, F, G, H, I, J, K	Uretritis, cervicitis, EIP ²	Contacto sexual, de manos a ojos, a través del parto

¹ Fomite: Cualquier objeto carente de vida o sustancia que es capaz de transportar organismos infecciosos tales como bacterias, virus, hongos o parásitos desde un individuo a otro.

² EIP: Enfermedad inflamatoria pelviana.

Diagnóstico de laboratorio

La muestra preferida es el hisopado endocervical en la mujer y el raspado uretral en el hombre. Las muestras de orina (primer chorro miccional) tienen peor recuperación de *C. trachomatis*, especialmente si se utilizan métodos de detección de antígenos o de cultivo, pero son muy útiles cuando se efectúa tamizaje poblacional y se emplean métodos de detección de ácidos nucleicos.

Los serotipos A, B, Ba y C son agentes de tracoma, enfermedad que causa la ceguera, especialmente en África y Medio Oriente. Las serovariedades desde la D a la K son las que corresponden a las infecciones genitales más comunes (uretritis y cervicitis con sus complicaciones). L1, L2, L2b y L3, por su parte, son agentes del linfogranuloma venéreo (tabla 2).

El diagnóstico de laboratorio puede hacerse por observación directa de cuerpos de inclusión, con colorante de Giemsa (muy poco sensible) o por inmunofluorescencia directa. Para esto se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína, dirigidos contra proteínas de membrana o lipopolisacáridos de este microorganismo. De esta manera se pueden observar no sólo los cuerpos de inclusión, sino también los cuerpos elementales con lo que se gana en sensibilidad. Sin embargo, estos cuerpos fluorescentes suelen confundirse con artefactos de la tinción, especialmente por personal no suficientemente entrenado. Se han desarrollado métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA) para detección de antígenos y otros métodos serológicos para la detección de anticuerpos, pero con resultados no satisfactorios. El cultivo, por requerir el uso de líneas celulares, es un método utilizado sólo en centros de referencia y tiene su mayor aplicación en la determinación fehaciente de abuso sexual. El método de elección para el diagnóstico de rutina es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Rickettsias y bacterias relacionadas

El género *Rickettsia* incluye al menos 25 especies de las cuales, la mayoría, son patógenas para el hombre, al cual acceden por picaduras de artrópodos. Las diferentes especies se diferencian en grupos: (1) grupo tífico (*Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, entre otras), asociado a piojos o pulgas; (2) grupo de las fiebres manchadas (más de 20 especies y subespecies), transmitido principalmente por garrapatas; (3) grupo transicional, transmitido por ácaros y pulgas; (4) un grupo llamado ancestral; y (5) *Orientia tsutsugamushi*, (diferente género).

El género *Ehrlichia* incluye cinco especies, el género *Anaplasma*, a tres, y el género *Neorickettsia*, a otras tres. Sólo 5 especies son patógenas para el hombre: *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Neorickettsia sennetsu*.

Todos son cocobacilos inmóviles, no esporulados, intracelulares, obligados de células eucariotas. Por características estructurales, se consideran bacterias gram negativas, a pesar de no teñirse con la coloración de Gram (pueden colorearse con Giemsa).

Los artrópodos son su principal reservorio en la naturaleza. El contagio de piojos se da, principalmente, en casos de hacinamiento y miseria (guerra, campos de refugiados, desastres naturales). En América del Sur, los Andes Peruanos son el principal foco endémico de enfermedades por rickettsias, pero la Argentina no escapa a este tipo de infecciones.

Las fiebres manchadas se transmiten por garrapatas del género *Ixodes* que se alimentan de sangre de mamíferos, aves y reptiles. La mordedura pasa generalmente desapercibida, en virtud de su pequeño tamaño y a que no es dolorosa.

La fiebre manchada de las Montañas Rocosas, producida por *R. rickettsii*, fue descrita en EE.UU., a fines del siglo XIX. Esta enfermedad se ha detectado en toda América, hasta el norte de Argentina.

Son enfermedades agudas, autolimitadas, que no dejan secuelas. Se caracterizan por presentar episodios febriles en su etapa inicial (cuadro gripal). Se pueden producir formas graves que incluso pueden llevar a la muerte. El alcoholismo, la diabetes y la edad avanzada son condiciones que predisponen. Entre las especies más virulentas de *Rickettsia* podemos citar a *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia conorii*.

Ehrlichia y *Anaplasma* se transmiten por mordeduras de garrapatas. La ehrlichiosis humana se caracteriza por un exantema maculopapular o petequial en casi la mitad de los casos. Las formas graves se dan en pacientes de edad avanzada e inmunocomprometidos (dificultad respiratoria, coagulopatía, hemorragia digestiva, insuficiencia renal, meningoencefalitis y *shock*).

Ni en *Rickettsia* ni en *Ehrlichia* se detectaron toxinas, ni otros factores que expliquen su patogenicidad. La bacteria invade a las células e incluso al endotelio de los vasos sanguíneos, por mecanismos desconocidos.

Su detección puede realizarse por: (1) cultivo en líneas celulares (reservado para centros de referencia), por detección de antígenos; (3) serología, por aglutinación (reacción de Weil-Félix, para rickettsias) o microinmunofluorescencia, para la que se requiere de sueros específicos dirigidos contra proteínas de superficie y; (4) por métodos moleculares. Para esto último se utiliza sangre entera anticoagulada o capa leucocitaria (preferiblemente con EDTA), biopsias de lesiones cutáneas, tejidos necróticos, líquidos biológicos, etc.

La PCR tiene una sensibilidad mayor del 70%. La identificación a nivel de especie se realiza por secuenciación de determinados genes.

El tratamiento de elección está basado en el uso de una tetraciclina (doxiciclina).

Bibliografía específica

Beard C, Azad A. Rickettsial Pathogens and their Arthropod Vectors. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 179-186.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 1108-1132.

- Parola P, Paddock CD, Raoult D.** Tick-borne rickettsiosis around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 719-756.
- Sharp SE** (ed.), p. 1-38. *Cumitech 44.* ASM Press, Washington DC, 2006.
- Souliou E et al.** Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 513-515.
- Stephens RS.** *Chlamydia.* Intracellular biology, pathogenesis, and immunity. ASM Press, Washington DC, 1999.
- Waites KB; Talkington DF.** *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.

CAPÍTULO 7

Anaerobios

El cultivo en anaerobiosis

Si bien la mayoría de los microorganismos clasificados como anaerobios no son capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno (anaerobios estrictos), hay algunos de ellos que pueden hacerlo en cantidades reducidas de ese gas (aerotolerantes), como algunas especies de *Actinomyces*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*.

Aunque haya superposiciones y ambigüedades, podemos clasificar a las bacterias en base a su requerimiento y/o tolerancia al oxígeno en: (1) **aerobios obligados**, (2) **microaerófilos**, (3) **anaerobios facultativos**, (4) **anaerobios aerotolerantes** y (5) **anaerobios obligados** (Tabla 1). De estos dos últimos nos ocuparemos en este capítulo.

Toma y transporte de las muestras

La toma y el transporte de las muestras son pasos vitales para conservar la viabilidad de estos microorganismos.

Lo primero que se tiene que tener en cuenta es que los anaerobios se encuentran en altas concentraciones en las mucosas, como parte de la microbiota habitual. Es así que muchas muestras carecen de valor para la búsqueda de anaerobios y sólo aquellos materiales provenientes de sitios normalmente estériles, son adecuados para este fin (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las bacterias según su requerimiento y/o tolerancia al oxígeno

Grupo	Aire (21% O ₂)	5% CO ₂ 15% O ₂	3-5% O ₂	Anaerobiosis (0% de O ₂)
Aerobios obligados	xxx	xxx	Xx	-
Microaerófilos	-	xx	xxx	x
Anaerobios facultativos	xxx	xxx	xxx	xxx

Anaerobios aerotolerantes	x	xx	xx	xxx
Anaerobios obligados	-	-	-	xxx

- No desarrollo, x Desarrollo pobre, xx Desarrollo moderado, XXX Desarrollo abundante.

El procedimiento habitual es obtener la muestra por punción o por biopsia. El hisopado resulta inadecuado por la gran exposición al oxígeno a la que se somete a la muestra. El material obtenido debe volcarse en un frasco libre de oxígeno (por ejemplo, frasco Tab®, Britania, Buenos Aires).

Cultivo propiamente dicho

Los materiales se siembran en medios líquidos o sólidos, especialmente diseñados para el buen desarrollo de microorganismos anaerobios. Básicamente, son medios que contienen hemina, vitamina K, extracto de levadura y L-cistina. Como medio sólido se puede utilizar agar sangre de oveja al 5% o agar sangre de caballo lacada (por calentamientos y enfriamientos sucesivos). Se los puede convertir en medios selectivos con el agregado de vancomicina y kanamicina. Como medios líquidos se pueden utilizar los caldos tradicionales adicionados de carne picada, cistina y extracto de levadura o caldo tioglicolato enriquecido con hemina y vitamina K.

Estos medios ya sembrados se incuban en bolsas de plástico herméticas individuales (Fig 1), en jarra anaeróbica (Fig 2) o si se procesa un número considerable de muestras, en cámara anaeróbica (Fig. 3).

Cuadro 1. Materiales aptos o no aptos para la búsqueda de anaerobios

Muestras adecuadas para el cultivo de anaerobios	Muestras no aptas para el cultivo de anaerobios
Sangre	Espujo, lavado bronquial, aspirado traqueal
LCR (no se utiliza de rutina por ser infrecuente la meningitis por anaerobios)	Lavado gástrico
Otros líquidos de punción: peritoneal, articular, líquido biliar, pleural, etc.	Materia fecal, excepto para búsqueda de <i>Clostridium difficile</i>
Materiales de abscesos o empiemas	Drenaje de colostomía
Materiales obtenidos por biopsia	Muestra de nasofaringe
Orina obtenida por punción vesical	Muestra de lesión cutánea obtenida con hisopo
Materiales endometriales o uterinos recolectados en forma adecuada	Exudado de fauces
Materiales obtenidos de tejidos profundos después de desbridamiento	Orina, excepto la obtenida por punción vesical

Médula ósea	Hisopado uretral
Material de oído medio obtenido por timpanocentesis	Flujo vaginal o exudado endocervical
Pus de senos paranasales obtenido por punción o cirugía	
Materia fecal para búsqueda de <i>Clostridium difficile</i>	



Figura 1. Incubación en bolsas individuales



Figura 2. Jarra anaeróbica con generador.



Figura 3. Cámara anaeróbica

Estos sistemas cerrados pueden convertirse en recipientes exentos de oxígeno básicamente por dos métodos: reemplazo de gases (jarras con manómetro o cámara anaeróbica) o uso de generadores de anaerobiosis. Si bien hay varios tipos de generadores, los más comunes son sobres con borohidruro de sodio u otro generador de hidrógeno, que libera este gas por contacto con el agua. La anaerobiosis se logra en un par de horas por combinación del hidrógeno con el oxígeno ambiente gracias a un catalizador de paladio (Fig. 3).

Si se espera que la muestra contenga alguna especie de *Clostridium* de crecimiento rápido (por ejemplo, muestra de tejido de un paciente con gangrena gaseosa), la jarra se abre a las 18 – 24 h. De lo contrario, se espera hasta las 48 h dado que los anaerobios desarrollan lentamente. En ese momento se subcultiva el caldo y se inspecciona la placa para ver la presencia de diferentes colonias, cada una de las cuales es repicada en una placa igual a la que soportó su desarrollo y en una placa de agar chocolate. La primera se incuba nuevamente en anaerobiosis y la de agar chocolate en microaerobiosis (jarra con vela). Si la bacteria desarrolla en esta última se continúa su identificación considerándola como facultativa. Si no lo hace, se efectúa una coloración de Gram de la placa anaeróbica, se puede comenzar con el proceso de identificación si el material es suficiente, pero igualmente se efectúa un nuevo doble repique como verificación final de su condición de bacteria anaerobia estricta.

Habitat

Se los encuentra colonizando especialmente las mucosas orofaríngea, intestinal, uretral y vaginal en muy altas concentraciones. Sólo unas pocas especies colonizan la piel (por ejemplo, *Propionibacterium* spp.) y lo hacen aprovechando algunos nichos ecológicos especiales como el bulbo piloso.

A partir de allí, pueden invadir tejidos más profundos por causa de traumas, cirugía, entre otras.

Importancia clínica de los anaerobios

La mayor parte de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas debido a que frecuentemente se originan por brechas abiertas en las membranas mucosas del organismo por las que penetran también cocos gram positivos y bacilos gram negativos facultativos hacia tejidos más profundos e incluso hacia el torrente sanguíneo.

No obstante, hay casos en que aparecen como único germen y otros en que generan enfermedades por liberación de toxinas *in situ* (tétanos = *Clostridium tetani*, botulismo infantil = *Clostridium botulinum*) o por ingesta de toxinas preformadas (botulismo clásico = *Clostridium botulinum*).

Las localizaciones más frecuentes pueden verse en el Cuadro 2.

Hay enfermedades características de ciertos anaerobios como la diarrea asociada a antibióticos o la colitis pseudomembranosa (*Clostridium difficile*; ver Parte IV, Capítulo 10, Diagnóstico de infecciones del tracto gastrointestinal).

La gangrena gaseosa es una enfermedad extremadamente grave cuyo origen, corrientemente, es una herida punzante, traumática o quirúrgica, que haya afectado a algún individuo inmunocomprometido, con problemas vasculares o quemaduras. También puede ocurrir en individuos previamente sanos: aborto séptico, lesión en el tracto gastrointestinal, cirugía. Es una enfermedad de progreso rápido, con la presencia de una zona edematizada en superficie y formación de gas en profundidad (crepitación). La infección progresa comprometiendo el músculo (mionecrosis) y a nivel sistémico con taquicardia, hemólisis intravascular, hemoglobinuria (orina color oporto), hipotensión e insuficiencia renal. Esto requiere un desbridamiento de los tejidos afectados y tratamiento precoz con penicilina. El agente más frecuente es *Clostridium perfringens*, aunque también pueden producirla otras especies de *Clostridium*.

Cuadro 2. Principales localizaciones de las infecciones por anaerobios

Infecciones abdominales	Infecciones de cabeza y cuello
<ul style="list-style-type: none"> • Peritonitis • Heridas posquirúrgicas • Aborto séptico 	<ul style="list-style-type: none"> • Absceso cerebral • Enfermedad periodontal y abscesos • Sinusitis crónica o en huésped inmunocomprometido • Otitis media crónica
Infecciones respiratorias	Otras
<ul style="list-style-type: none"> • Neumonía aspirativa • Empiema pleural • Absceso pulmonar 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteriemia • Osteomielitis crónica

Anaerobios de importancia clínica

Al igual que en el caso de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, los podemos agrupar en bacilos y cocos gram negativos y bacilos y cocos gram positivos.

Bacilos y cocos gram negativos anaerobios

Los bacilos gram negativos más importantes desde el punto de vista clínico son las especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*.

Las especies de *Bacteroides*, en especial las del grupo *Bacteroides fragilis*, son las más frecuentemente encontradas entre las infecciones por anaerobios. Son las más involucradas en infecciones que se producen por debajo de la cintura.

Por el contrario, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* frecuentemente producen infecciones de cabeza y cuello y pleuropulmonares.

El uso de discos comerciales de bilis, vancomicina, kanamicina y colistina y la observación microscópica (Gram), permiten realizar una identificación preliminar de estos bacilos con fines de lograr una orientación para luego completar la identificación con otros métodos más precisos.

Los cocos gram negativos, aunque muy poco frecuentes, son principalmente los del género *Veillonella* que pueden aparecer como parte de infecciones mixtas, aunque se desconoce si juegan algún rol en ellas.

Bacilos y cocos gram positivos anaerobios

Los bacilos gram positivos anaerobios se dividen en esporulados (*Clostridium*) y no esporulados.

La importancia clínica de algunos de ellos ya se describió previamente.

La asociación de *Clostridium septicum* con enfermedades malignas se conoce desde hace ya cuatro décadas, en que se vio su relación con algún tipo de leucemia, carcinoma de colon y otras.

Otras especies de *Clostridium* han sido también aisladas a partir de bacteriemias de pacientes con distintas enfermedades malignas: *C. perfringens*, *Clostridium sporogenes* y *Clostridium tertium* entre los más frecuentes.

Los bacilos gram positivos no esporulados frecuentemente son contaminantes de materiales clínicos a partir de la incorporación de gérmenes de la microbiota habitual de las mucosas a las muestras. No obstante pueden participar de infecciones mixtas o afectar a pacientes inmunocomprometidos.

Los cocos gram positivos anaerobios (géneros *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Finnegoldia*, *Anaerococcus*, etc.), generalmente aparecen en infecciones polimicrobianas y se los puede separar de los microorganismos microaerófilos por su sensibilidad al metronidazol.

Identificación

Dentro de estas bacterias hay algunas con características morfológicas microscópicas muy particulares (*Clostridium*, *Fusobacterium*), con formas características de sus colonias (*Fusobacterium nucleatum*) o con formación de pigmentos (*Prevotella*, *Porphyromonas*). Su sensibilidad diferencial respecto a ciertos antibióticos y algunas otras pruebas simples, permiten una identificación presuntiva inicial (Tabla 2), pero en muchos casos, sobre todo para llegar con seguridad a identificar la especie, es necesario apelar a cromatografía en fase gaseosa (actualmente en desuso), espectrometría de masas o, mejor, secuenciación de ciertas porciones de su ADN. Algunos métodos miniaturizados o automatizados también pueden contribuir a una identificación preliminar.

Las características que permiten una orientación primaria pueden verse en las tablas 2 y 3. Las propiedades principales de las distintas especies de *Clostridium* pueden verse en la tabla 3.

Un medio diferencial para clostridios es el agar yema de huevo, que permite determinar la presencia de lipasa y lecitinasa (Fig 4).

Esta prueba puede hacerse más específica hisopando media placa con una solución de antitoxina. En esa hemiplaca no se producirá la precipitación observada en la otra mitad.



Figura 4. Desarrollo de *Clostridium perfringens* en agar yema de huevo. La presencia de lecitinasa se manifiesta por el precipitado blanquecino y opaco que aparece alrededor de las colonias. Nótese el contraste con el color amarillento del medio de cultivo.

Tabla 2. Identificación presuntiva de los anaerobios

Especie	Gram	KAN	VAN	COL	Bilis	Indol	Pig	NIT	Urea
Grupo <i>B.fragilis</i>	B	R	R	R	R	V	-	-	-
<i>Prevotella</i>	CB	R	R	R/S	S	V	+	-	-

<i>Porph.</i>	CB	R	S	R	S	+	+	-	-
<i>Fuso.</i>	B*	S	R	S	V	V	-	-	-
Otros BGN	B	S	R	S	V	-	-	V	V
Cocos -	C	S	R	S	S	-	-	+	-
Cocos +	C	V	S	R	NA	V	-	-	-
<i>Clostridium</i>	B	S	S	R	NA	V	-	V	V
Otros BGP	B	S	S	R	NA	V	-	V	V

KAN: kanamicina 1000 µg, VAN: vancomicina 5 µg, COL: colistina 10 µg, Pig: pigmento, NIT: reducción de nitratos, Mov: movilidad, *Porph.* : *Porphyromonas* , *Fuso.*: *Fusobacterium*, C : cocos, CB: cocobacilos, B: bacilos, B*: bacilos fusiformes o pleomorfos. V: variable, NA: no aplicable.

Tabla 3. Identificación presuntiva de algunas especies de *Clostridium*

Especie	Indol	Lecitinasa	CAMP invertida	Ureasa	Nitratos
<i>C. perfringens</i>	-	+	+	-	+
<i>C. baratii</i>	-	+	-	-	V
<i>C. sordellii</i>	+	+	-	+	-
<i>C. bifermentans</i>	+	+	-	-	-
<i>C. septicum</i>	-	-	-	-	V
<i>C. difficile</i>	-	-	-	-	-

V = variable

También puede realizarse la prueba de CAMP invertida efectuando una estría con una cepa conocida de *Streptococcus agalactiae* y cruzando otra estría del bacilo gram positivo anaerobio a identificar. En la zona de contacto, se producirá el refuerzo de la hemólisis determinado por la hemolisina del *Clostridium perfringens* y el factor CAMP del estreptococo.

CAPÍTULO 8

Espiroquetas

Si bien hay otros géneros dentro del orden Spirochaetaceae, en este capítulo se tratarán sólo las características correspondientes a bacterias de los géneros *Leptospira*, *Borrelia* y *Treponema*.

Se trata de bacilos gram negativos largos, helicoidales, que presentan fibrillas axiales y una vaina externa que las contiene. Las fibrillas son como flagelos que se enrollan en la pared celular y quedan fijados por unas placas llamadas discos de inserción.

Los diferentes géneros tienen diferente número de fibrillas y de discos: *Leptospira* (2 fibrillas y de 3 a 5 discos), *Borrelia* (30 a 40 fibrillas y 2 discos) y *Treponema* (6 a 10 fibrillas y 1 disco).

Los treponemas son muy delgados, tanto que a pesar de su longitud, en la mayoría de los casos, no se pueden observar al microscopio con la coloración de Gram. Para observar la presencia de *Treponema pallidum* es necesario realizar alguna tinción argéntica (por ejemplo, Fontana-Tribondeau) o la observación en campo oscuro. *Leptospira* y *Borrelia* son más gruesas. Estas últimas pueden observarse como gram negativas en la tinción de Gram. *Leptospira* tiene los extremos en forma de gancho (Fig. 1).

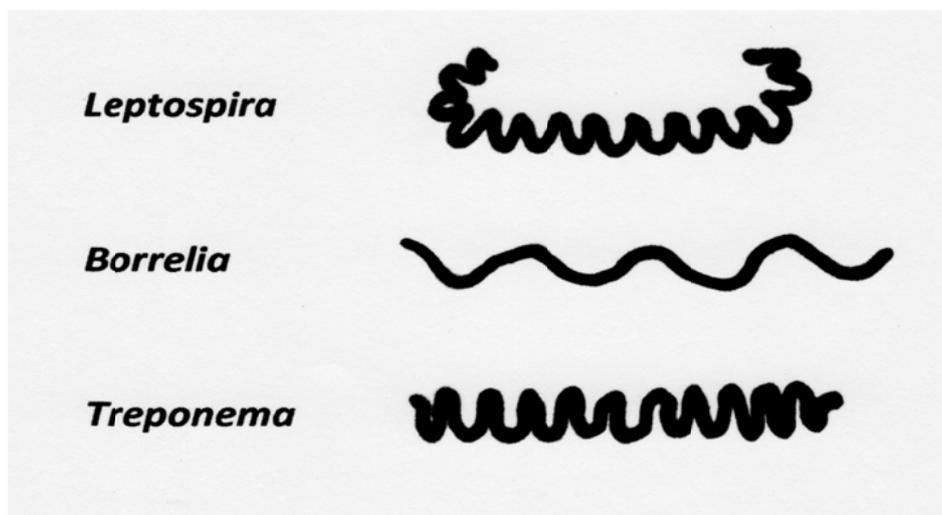


Figura 1. Morfología microscópica de las espiroquetas (esquema)

Leptospira

Existen leptospiras de vida libre y otras que resultan ser patógenas para el hombre y los animales (mamíferos, reptiles, anfibios, peces, aves e invertebrados).

Leptospira interrogans es la especie que produce la enfermedad conocida como leptospirosis, que es una zoonosis de distribución mundial, pero más frecuente en países de clima cálido y en vías de desarrollo.

El hombre se infecta por contacto directo o indirecto a través de la orina o sangre de animales crónicamente infectados. Las ratas son reservorios universales de *Leptospira*. Estos microorganismos pueden ingresar a través de lesiones cutáneas o por las conjuntivas. Puede tratarse de una enfermedad ocupacional (peones de campo, trabajadores de frigoríficos o mataderos, y veterinarios) y, generalmente, ocurre en forma de brotes por contaminación de una fuente común. El pico de incidencia se da en verano, época en la cual la bacteria puede sobrevivir durante más tiempo en el ambiente y la exposición al agua contaminada es más frecuente.

Las leptospiras pasan a la sangre y pueden diseminarse a diferentes órganos, especialmente sistema nervioso central y riñones.

La enfermedad consiste de cefaleas, fiebre y mialgia que aparecen entre los 4 y 20 días después de la exposición. Pueden darse dos tipos de síntomas: (a) la leptospirosis anictérica, autolimitada (3 a 7 días de fiebre elevada), pero que continúa con un estado de inmunidad (IgM) que puede manifestarse como una meningitis aséptica y (b) la leptospirosis icterica o enfermedad de Weil, más grave, con disfunción hepática, renal o vascular. Los signos iniciales de la infección grave son ictericia, hemorragia y hepatoesplenomegalia. La mortalidad puede llegar hasta un 10%.

El diagnóstico de laboratorio se basa en que durante los diez primeros días de la enfermedad hay leptospiras en la sangre y en el LCR. En la orina aparecen más tardíamente (8 a 30 días).

Se puede observar la bacteria por microscopía de campo oscuro en las muestras de sangre, LCR y orina. Puede aumentarse la sensibilidad del método centrifugando a 1.500g durante 30 minutos. La sangre debe procesarse previamente con oxalato de sodio o heparina y centrifugación a 500g para eliminar los eritrocitos.

También pueden emplearse métodos moleculares para su detección (uso de sondas específicas, PCR).

El método de referencia es el cultivo en un medio semisólido enriquecido con suero de conejo (medio de Fletcher).

La sangre debe ser anticoagulada con oxalato de sodio o heparina. La orina debe sembrarse rápidamente (la acidez daña las espiroquetas).

La incubación se realiza a 30°C en oscuridad, hasta 6 semanas. Semanalmente, se deben tomar pequeñas porciones de medio a 2 cm por debajo de la superficie y observar en campo oscuro.

También puede diagnosticarse por estudio serológico, observando un incremento de por lo menos cuatro veces en el título de anticuerpos entre la fase aguda y la convaleciente. Títulos mayores de 1:400 pueden considerarse también como de valor diagnóstico a los fines clínicos. Esto puede realizarse por aglutinación en microscopio (campo oscuro), aglutinación macroscópica, hemaglutinación directa o enzimoimmunoensayo.

Existe una vacuna para los animales domésticos. También puede prevenirse la enfermedad controlando la proliferación de roedores y evitando la inmersión en lagunas de agua dulce.

Borrelia

Como se dijo, los microorganismos del género *Borrelia* se tiñen bien con la coloración de Gram. Además hay especies que son cultivables *in vitro*, a diferencia de *Treponema*. Producen infecciones en animales y en el hombre, infecciones transmitidas por ácaros o piojos como la fiebre recurrente humana y la enfermedad de Lyme.

La fiebre recurrente es una enfermedad de distribución universal producida por varias especies diferentes de *Borrelia* y se transmite por picaduras de piojos o ácaros. El reservorio lo constituyen los roedores y el propio ser humano. Se caracteriza por fiebre, mialgias y cefaleas, que desaparecen y vuelven a emerger.

La enfermedad de Lyme es transmitida por picadura de ácaros del género *Ixodes*. La producen sólo cuatro especies del complejo *Borrelia burgdorferi* y los reservorios naturales son los propios ácaros, roedores y ciervos.

Esta enfermedad presenta tres estadios. (1) Eritema migrans: Lesión cutánea rojiza, que aparece primero en el sitio de la picadura, pero luego puede ocurrir en sitios distantes. Su forma de aros concéntricos, como si fuera un blanco de tiro, resulta característica. El paciente puede tener fiebre y malestar general en este período. (2) Artritis, trastornos neurológicos y carditis. (3) Artritis crónica.

Si bien se pueden observar las borrelias directamente de sangre periférica, en campo oscuro o a través de coloraciones, y se pueden cultivar, los métodos serológicos son por el momento los más apropiados para el diagnóstico de estas enfermedades (sobre todo la enfermedad de Lyme). La microscopía es poco sensible y el cultivo muy engorroso.

Treponema

Los microorganismos del género *Treponema* pueden formar parte de la cavidad oral u otras mucosas de los seres humanos (*Treponema denticola*, *Treponema refringens*, etc.), producir patologías asociadas con microorganismos anaerobios como la angina de Vincent (*Treponema vincentii*) o enfermedades de transmisión sexual como la sífilis (*Treponema pallidum*). Las

características de estas enfermedades y su diagnóstico microbiológico se desarrollarán en los capítulos 1a y 12 de la parte IV.

Es importante destacar que *T. pallidum* no puede observarse con la coloración de Gram y hasta el momento no ha podido ser cultivado en medios artificiales. Para su propagación y para poder efectuar pruebas de sensibilidad a los antibióticos, se utiliza el modelo de inoculación intratesticular en conejos.

PARTE IV

Procesamiento de materiales clínicos humanos

CAPÍTULO 1

Infecciones respiratorias altas

Tracto respiratorio superior

El tracto respiratorio superior comprende la zona orofaríngea, hasta la tráquea, los senos paranasales y el oído medio (Fig.1).

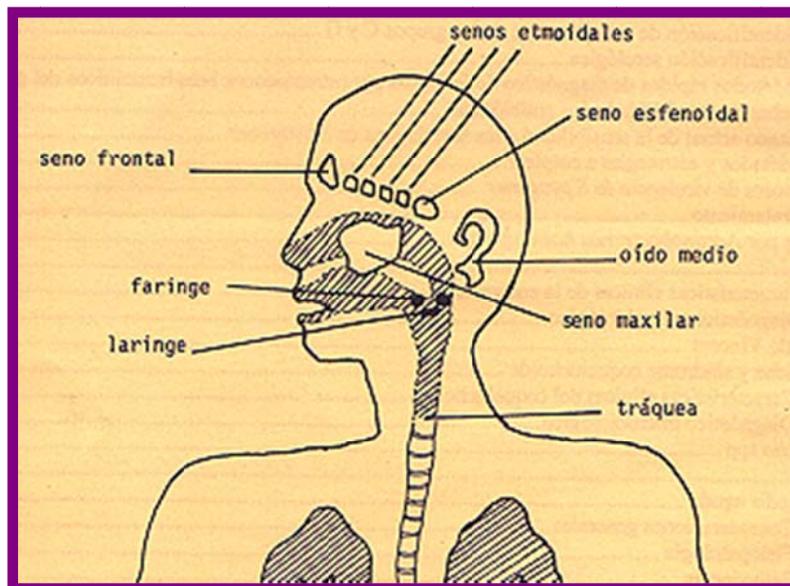


Figura 1: Tracto respiratorio superior incluyendo oído y senos paranasales

La boca, encías, faringe, nasofaringe y hasta la laringe están fuertemente colonizadas con bacterias que forman parte de la microbiota habitual. No obstante, algunas de esas bacterias en determinadas condiciones pueden producir procesos infecciosos de diversa gravedad. El mayor porcentaje corresponde a bacterias anaerobias. En algunas circunstancias, incluso, algunas bacterias patógenas para el hombre, pueden estar colonizando las fauces en forma transitoria. Tanto los senos paranasales como el oído medio normalmente se encuentran exentos de microorganismos. La eliminación de bacterias de ciertas zonas (por ejemplo, nasofaringe) ocurre por acción del movimiento

de las ciliadas que presentan las células epiteliales y por el arrastre del mucus segregado por las células caliciformes (Fig. 2).

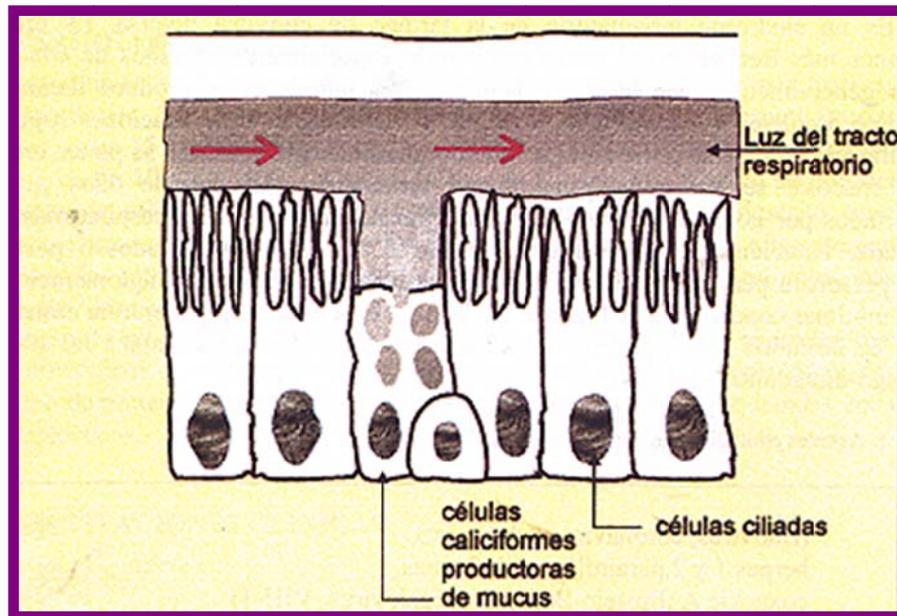


Figura 2. Acción de las células ciliadas de la nasofaringe

Faringitis

Faringitis aguda: Síndrome inflamatorio de la faringe, causado por distintos microorganismos.

Faringitis estreptocócica aguda: Faringitis aguda causada por *Streptococcus pyogenes*. (estreptococos beta-hemolíticos del grupo A) o *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (grupos C y G)

Epidemiología

La faringitis estreptocócica da cuenta del 25-30% de las faringitis del niño, dependiendo del factor estacional: en nuestra región es más frecuente en primavera y otoño que en invierno o verano. Se halla entre las infecciones bacterianas más comunes en la niñez. También es una afección frecuente en adultos, pero por lo general reviste menos importancia porque las complicaciones son muy raras.

Los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A son responsables de la gran mayoría de dichas infecciones, pero en ocasiones pueden participar cepas de estreptococos beta-hemolíticos de los serogrupos C o G (colonia grande) pertenecientes a la subespecie *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

La enfermedad aparece principalmente entre los niños de 5 a 15 años, con mayor incidencia en los primeros años escolares. Sin embargo todos los grupos etarios son susceptibles.

La enfermedad se extiende por contacto directo persona a persona, con mayor probabilidad a través de gotitas de saliva o secreciones nasales. Los índices de portación asintomática varían con localizaciones geográficas, y la estación del año en los escolares normales, y es menor en los adultos. De ahí que también haya una variación estacional en la incidencia de la enfermedad.

Manifestaciones clínicas

El período de incubación es de 2 a 4 días. El inicio de la enfermedad es anunciado por el comienzo algo brusco de odinofagia (dolor al deglutir), acompañada por malestar general, hipertermia (fiebre) y cefalea. Las náuseas, los vómitos y el dolor abdominal son comunes en los niños.

En el examen físico, se observan generalmente las amígdalas inflamadas, dolorosas al tacto, muy rojas y muchas veces cubiertas por un exudado blanco grisáceo. Los pacientes que han sufrido amigdalectomía suelen experimentar un síndrome clínico más leve. Los signos clínicos se confunden con los de las faringitis virales, por lo que no contribuyen al diagnóstico etiológico.

No obstante hay guías que permiten descartar la etiología bacteriana a través de la suma de manifestaciones propias de la angina viral (Cuadro 1).

Complicaciones

Supurativas

En la era posantibiótica son muy raras: abscesos periamigdalinos, otitis media aguda o sinusitis aguda, linfadenitis, meningitis (rara), abscesos cerebrales (rara), neumonía (rara), entre otras. Y, por lo general, se originan por contigüidad a partir de faringitis mal curadas, aunque en algunas de ellas no se descartan y hasta es más probable la vía hematógena.

La diseminación por vía hematógena puede producir artritis supurada, endocarditis (rara), osteomielitis (rara), abscesos en general (raros), entre otros. Es mucho más frecuente la diseminación hematógena de *S. pyogenes* a partir de infecciones de tejidos blandos, que a partir de faringitis.

Cuadro 1. Signos y síntomas que según la guía de la Infectious Diseases Society of America (IDSA), contribuyen a sospechar o descartar una faringitis estreptocócica

Faringitis estreptocócica	Faringitis viral
Comienzo agudo	Conjuntivitis
Edad : 5 – 15 años	Coriza
Fiebre	Tos

Cefaleas	Diarrea
Náuseas, vómitos, dolor abdominal	Disfonía
Inflamación de las amígdalas	Estomatitis ulcerativa discreta
Exudados localizados en faringe o amígdalas	Exantema viral
Petequias en el paladar	
Adenitis cervical anterior	
Presentación en invierno o primavera	
Exposición a pacientes con faringitis estreptocócica	
<i>Rash</i> escarlatiniforme	

Complicaciones no supurativas

Las complicaciones no supurativas son la artritis reactiva, la fiebre reumática y la glomerulonefritis.

La **fiebre reumática** se manifiesta alrededor de tres semanas después de un episodio de faringitis. Este período de latencia es asintomático. La enfermedad se manifiesta como una reacción inflamatoria no purulenta de ciertos órganos, principalmente las articulaciones, el corazón y el cerebro. Si bien desde la década del 50 se conoce la asociación de la fiebre reumática con una infección estreptocócica previa, todavía se desconoce cuál es el mecanismo exacto que la origina. Lo que se sabe es que dentro de un grupo de personas, sólo unas pocas, portadoras de ciertos antígenos de histocompatibilidad, son susceptibles. Por otra parte, las cepas portadoras de sólo unos pocos de los más de 80 serotipos M de estreptococos, (especialmente M1, M3, M5, M6 y M18 mucoide) han sido reconocidas como desencadenantes de esta enfermedad. La fiebre reumática es una complicación que ha sufrido una notable disminución en incidencia a lo largo del siglo XX en países desarrollados, pero continúa siendo un problema grave en el norte de la India y entre poblaciones aborígenes de Australia y Fiji.

La **glomerulonefritis** aparece entre una y tres semanas después de un episodio de faringitis o después de tres a seis semanas de una piodermatitis estreptocócica. Previamente a la glomerulonefritis, el paciente puede presentar fiebre, persistir la faringitis o permanecer asintomático.

La presentación clínica es variable: los síntomas más comunes son edema, hematuria macroscópica y dolor lumbar. En el comienzo, son comunes algunos síntomas inespecíficos como anorexia, malestar general, náuseas y vómitos. La mitad de los pacientes padecen de oliguria (disminución del volumen miccional), pero raras veces de anuria (ausencia de micción). La hipertensión se produce en un 60 - 80% de los pacientes, pero las complicaciones neurológicas derivadas de la misma son muy poco frecuentes (<1% de los pacientes con convulsiones o

encefalopatías). Al igual que en el caso de la fiebre reumática, sólo unas pocas cepas de *Streptococcus pyogenes* son capaces de producir glomerulonefritis (nefritogénicas). Una posible explicación para el desarrollo de la enfermedad, es que estas cepas nefritogénicas producirían proteínas con determinantes antigénicos especiales, con afinidad por ciertos sitios ubicados en el glomérulo normal. Las bacterias las volcarían a la circulación desde la piel o la faringe, donde se encontrarán asentadas y finalmente llegarían a los glomérulos. Una vez adheridas a los glomérulos, interaccionarían con anticuerpos antiestreptocócicos circulantes y formarían inmunocomplejos.

La **fiebre reumática** se manifiesta con fiebre, carditis (inflamación del músculo cardíaco), nódulos subcutáneos y poliartritis (inflamación de varias articulaciones). Ocurre alrededor de 3 semanas después de un episodio de faringitis. El posible mecanismo sería el de autoinmunidad, generada por la similitud entre antígenos estreptocócicos y antígenos presentes en los tejidos afectados. De esta manera, se produciría la agresión de los tejidos por parte de anticuerpos generados contra el estreptococo.

La **artritis reactiva** se puede definir como una fiebre reumática sin compromiso cardíaco ni cerebral.

Tanto en el caso de la fiebre reumática como en el de la glomerulonefritis, es difícil rescatar a los estreptococos responsables a partir de exudados faríngeos practicados en el momento en que se efectúa el diagnóstico de cualquiera de estas dos complicaciones. Obviamente, tampoco es posible aislarlos de otro tipo de muestras, pues los estreptococos actuaron previamente y luego desaparecieron de los sitios iniciales (fauces o piel), pero nunca estuvieron presentes como tales en las articulaciones, el corazón, el cerebro o el riñón.

La **escarlatina** es una faringitis complicada por haberse producido con una cepa productora de toxina. El microorganismo puede ser aislado de las fauces, mientras que las manifestaciones cutáneas de la enfermedad son asépticas (no se aíslan bacterias a partir de ellas).

Diagnóstico desde el laboratorio

Cultivo de exudado faríngeo (exudado de fauces)

Se trata del cultivo de un hisopado efectuado en las amígdalas o pilares (Fig. 3 y 4). El objetivo es realizar el diagnóstico bacteriológico de la angina estreptocócica.

Eventualmente, de acuerdo con las características de la lesión o a pedido del médico, se podrán investigar otras etiologías que requieren procedimientos especiales (faringitis por *Candida* spp., angina de Vincent, difteria, faringitis gonocócica). Otros casos especiales son la investigación de colonización orofaríngea en pacientes inmunocomprometidos, de dudosa utilidad, y la búsqueda de portadores de diversos microorganismos, que se realizarán de acuerdo a pautas de trabajo de cada centro y en situaciones particulares.

Para tomar la muestra de exudado de fauces se coloca la cabeza del paciente en hiperextensión. Con bajalenguas se presiona ligeramente la lengua hacia abajo. Con hisopo estéril se toma el exudado si estuviera presente en forma evidente (Fig. 3). De lo contrario, se hisopan ambas

amígdalas o ambos pilares, sin tocar zonas adyacentes (Fig. 4). Se introduce el hisopo en un tubo de ensayo estéril y seco o con medio de transporte (Stuart o similar) o con 0,5 ml de solución fisiológica. La muestra se debe dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Pruebas rápidas para la detección de antígenos de *Streptococcus pyogenes*.

En esta instancia se deberá tomar la muestra con doble hisopo, no olvidándose que al menos uno de ellos sea de dacrón (para el método rápido). El método de aglutinación con partículas de látex previa extracción enzimática es poco sensible, por lo que se desarrollaron otros métodos más sensibles y específicos: inmunocromatografía y enzimo-inmunoensayo (ELISA). No obstante, como su sensibilidad no supera el 90% y se han registrado diferencias entre los distintos equipos, se recomienda efectuar el cultivo si esta prueba resultara negativa. Existe riesgo de complicaciones supurativas o no supurativas por resultados falsamente negativos. Como la especificidad es muy buena (>95%), si el resultado fuera positivo, se informa. El riesgo es de sobreutilización de penicilina, capaz de generar efectos adversos graves (shock anafiláctico despreciable).

Procesamiento

No se efectúa de rutina la coloración de Gram de un extendido del material extraído, pues en casi todos los casos se observará una microbiota polimicrobiana que no tiene valor predictivo.



Figura 3. Exudado blanquecino típico, aunque no patognomónico de *Streptococcus pyogenes*

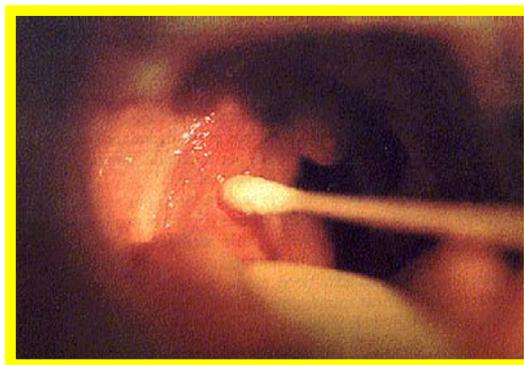


Figura 4. Cuando no se observa ningún exudado, se hisopan ambas amígdalas o ambos pilares

Se siembra hisopando una porción de una placa de agar sangre de carnero al 5-7 %. Luego se aísla con el ansa, y con ella se quiebra el agar en la parte de mayor inóculo, para observar la hemólisis subsuperficial de las cepas que producen beta-hemólisis sólo cuando la tensión de oxígeno es reducida (cepas con déficit de estreptolisina S, Fig. 5).

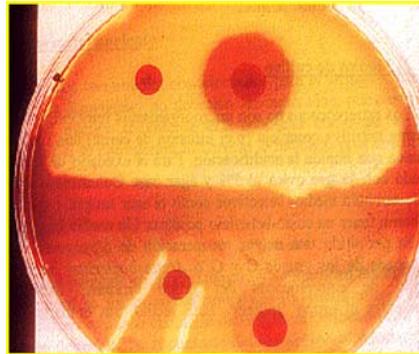


Figura 5. Desarrollo de beta-hemólisis en estrías subsuperficiales en una cepa carente de estreptolisina S (hemiplaca inferior). Nótese la diferencia con la bacteria desarrollada en la hemiplaca superior que posee ambas estreptolisinas. Tomada de Lopardo et al. (1998).

Se incuba a 35 - 37° C. durante 18-24 h. en atmósfera normal.

Se observa la producción de beta-hemólisis, para seleccionar las colonias a identificar. Si no hay colonias beta-hemolíticas, se incuba otras 24 horas y se vuelve a observar. Si, por el contrario, hay colonias beta-hemolíticas, se toman 4 a 5 de ellas y se efectúan las pruebas de sensibilidad a la bacitracina y la prueba de la L-pirrolidonil- β -Naftilamidasa (PYR). También se pueden hacer pruebas serológicas.

Casos especiales de indicación de hisopado faríngeo

1. Búsqueda de *Candida* spp. Con el hisopo estriar un tubo con agar glucosado de Sabouraud y una placa de agar sangre como en el caso rutinario. Incubar 5 días a 37° C. Con el mismo u otro hisopo, realizar una suspensión con una gota de solución fisiológica para efectuar un examen en fresco y, además, un extendido, y colorearlo con la tinción de Gram.
2. Angina de Vincent. Descartar *Candida* spp. y estreptococos del grupo A por los métodos habituales. Efectuar dos extendidos con otro hisopo, uno colorearlo con tinción de Gram, el otro con azul de metileno durante 1 minuto. Se observará la típica asociación fusoespirilar formada por bacilos gram negativos fusiformes anaerobios del género *Fusobacterium* y espirilos gram negativos pálidos, con espiras laxas, de la especie *Treponema vincentii* (Fig. 6).

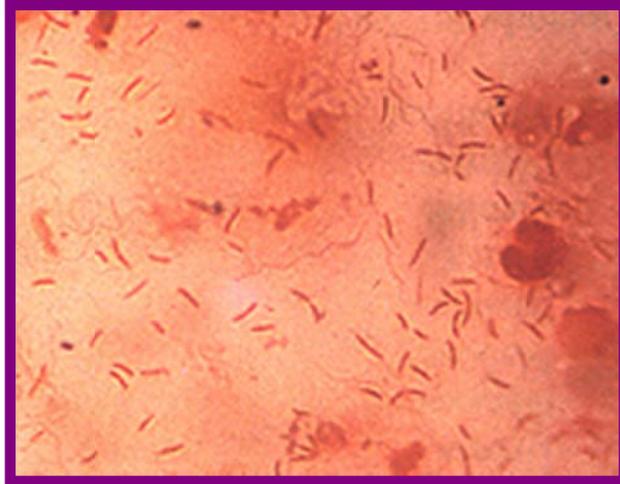


Figura 6. Asociación fusoespirilar observada por coloración de Gram en un caso de angina de Vincent

3. Difteria. (ver Parte III, capítulo 4). La toma de muestra se efectúa intentando arrancar la pseudomembrana con el hisopo (Fig.7). Con ella se efectuará una coloración de Gram donde se apreciará la posible presencia de bacilos gram positivos diftermorfos con las típicas disposiciones en letras chinas o en empalizada. Se sembrarán medios especiales: Medio de Loeffler, Medio de Horgan y Marshall, eentre otros. Derivar a un centro de referencia (ver Parte III, Capítulo IV).



Figura 7. Seudomembrana diftérica (Foto tomada de www.cdc.gov)

4. Gonococo. Sembrar una placa de agar chocolate, otra de agar Thayer-Martin, sin realizar ningún tipo de observación microscópica directa debido a que produciría mayor confusión por la frecuente presencia de *Moraxella catarrhalis* y cocos gram negativos anaerobios.
5. Colonización orofaríngea en pacientes inmunocomprometidos. Sembrar una placa de agar sangre como para los casos de rutina y un tubo de agar Sabouraud, incubar durante 48h y 5 días, respectivamente. Se pueden reemplazar por medios cromogénicos específicos o medios selectivos (Chapman para *Staphylococcus aureus*, agar cetrimida para *Pseudomonas* del

grupo fluorescente, etc.) con o sin el agregado de antibióticos para la búsqueda de cepas con resistencias especiales. En este tipo de pacientes podrían interesar: bacilos gram negativos (Enterobacterias y *Pseudomonas*), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aspergillus* spp. o *Candida* spp. Sin embargo, no se trata de cultivos realizados en forma rutinaria, dado que no resultan costo-efectivos.

6. Búsqueda de *Arcanobacterium haemolyticum* (ver Parte III, capítulo 4). Esta bacteria es un agente reconocido de faringitis y se la aísla frecuentemente de exudados de fauces de adolescentes sintomáticos. Frecuentemente, se acompaña de *rash* escarlatiniforme.

Se trata de cocobacilos gram positivos que pueden aparecer arracimados, en V o con ramificaciones rudimentarias, similares a los difteromorfos. Desarrollan produciendo hemólisis beta en sangre humana, pero no tan evidente en sangre ovina. Su crecimiento se produce entre las 24 y 72 horas, por lo que se sugiere incubar las placas hasta 3 días a 35°C en atmósfera con 5-10% de CO₂.

Su identificación se basa en las siguientes pautas: dan negativas las pruebas de catalasa, movilidad, gelatinasa, ureasa, xilosa, manitol y esculina; dan positivas las pruebas de fermentación de glucosa y maltosa, y las pruebas de reducción de nitratos y de fermentación de sacarosa son variables. Es positiva la prueba de CAMP invertida.

Otitis

Es la infección del conducto auditivo y según su localización anatómica la podemos dividir en **otitis externa** y **otitis media**.

Otitis externa

Existe una microbiota habitual del conducto auditivo externo. En esa localización puede haber gérmenes que son colonizantes habituales de la piel como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. y, en menor proporción, anaerobios y bacilos gram negativos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*. En determinadas condiciones de gran humedad y temperatura pueden invadir la piel y producir inflamación y/o supuración.

La otitis externa es la infección del conducto auditivo externo. Puede ser localizada, difusa, crónica o maligna.

Otitis externa localizada

Se presenta como pústula o forúnculo asociada a un folículo piloso. Los gérmenes responsables son *S. aureus* y menos frecuentemente *S. pyogenes*. El tratamiento es local, drenaje y utilización de antibióticos sistémicos. Sólo tiene valor el cultivo del material obtenido por punción aspiración.

Otitis externa difusa

La otitis externa aguda difusa comúnmente se conoce como "oído del nadador". Casi siempre es producida por *Pseudomonas aeruginosa*. En la otitis externa aguda el tratamiento es empírico y consiste en la instilación de gotitas de solución de alcohol-ácido acético o alcohol boricado. No debe cultivarse.

Otitis externa crónica

Se produce por irritación local generada por el material purulento proveniente del oído medio a partir de una otitis media aguda supurada. El tratamiento está dirigido a curar la otitis media. Sólo se debe cultivar el material obtenido del oído medio por aspiración transtimpánica.

Otitis externa maligna

Es una infección del conducto auditivo externo de pacientes diabéticos o con otras causas de inmunodepresión (por ejemplo, leucemia) que se disemina a partes blandas adyacentes, vasos sanguíneos y hueso. *Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno responsable.

Se debe cultivar la secreción en agar sangre y CLDE y realizar hemocultivos.

Otitis media

Se clasifica en **otitis media aguda (OMA)**, **otitis media supurada (OMS)** y **otitis media crónica (OMC)**

La OMA se define como un proceso inflamatorio agudo de la mucosa del oído medio. Se puede dar en todas las edades, pero con mucho más frecuencia en niños de 3 a 24 meses. Esto es así porque las características anatómicas de los niños de estas edades facilitan el flujo de las secreciones orofaríngeas hacia el oído a través de las trompas de Eustaquio.

La patogenia de la OMA es compleja y multifactorial. Las bacterias responsables de la OMA colonizan primero el epitelio nasofaríngeo y llegan luego al oído medio a través de las trompas de Eustaquio por aspiración o inyección directa al soplar, estornudar o bostezar. Generalmente, está precedida de una infección viral que conduce al bloqueo del mecanismo de defensa mucociliar. La infección ocurre cuando el inóculo alcanzado es grande o cuando los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos están alterados.

Diagnóstico microbiológico

1. Toma de muestra

La única muestra válida para el estudio microbiológico de la OMA es la punción del contenido del oído medio por timpanocentesis. Este procedimiento es realizado por un otorrinolaringólogo o pediatra entrenado. Se realiza de rutina en cuadros severos, persistencia de exudado, falla de tratamiento, en menores de tres meses y en huéspedes inmunocomprometidos.

El procedimiento se realiza bajo visión con otomicroscopio binocular. Se efectúa una limpieza del conducto auditivo externo con alcohol boricado al 70 % que luego se elimina por succión.

Se realiza la punción timpánica con aguja *butterfly*, sin alas, adosada a una jeringa de 5 ml cargada con 1 ml de solución fisiológica estéril. La punción de la membrana se realiza en el cuadrante posteroinferior, ya que es la zona que presenta más declive y de esta manera se asegura el drenaje completo de la caja timpánica. Se coloca el material en frascos de transporte anaeróbico para el cultivo (por ejemplo, TAB® Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) y se envía inmediatamente al laboratorio de Microbiología.

2. Procesamiento

Al material se le efectúa una coloración de Gram y se siembra en agar sangre, agar chocolate y caldo tioglicolato. Se incuba durante 48-72h en atmósfera con 5% de CO₂. Se pueden agregar medios de cultivo para anaerobios (agar sangre con vitamina K y caldo anaeróbico incubados en ausencia de oxígeno) porque se recuperan mejor los neumococos en estas condiciones, a pesar de ser microorganismos facultativos.

En caso de tratarse de una otitis bilateral se debe cultivar el material obtenido de los dos oídos ya que no es infrecuente la presencia de diferentes microorganismos en ambos. También pueden obtenerse cultivos mixtos del mismo oído. Los agentes más frecuentes en pediatría pueden verse en la siguiente tabla tomada de un estudio de más de 400 niños con OMA (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes etiológicos de otitis media aguda obtenidos de pacientes inmunocompetentes por punción timpánica¹

Microorganismo	N	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	129	39,5
<i>Haemophilus influenzae</i>	122	37,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	8,6
<i>Moraxella catarrhalis</i>	20	6,1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	3,0
<i>Turicella otitidis</i>	6	1,8
Otros	11	3,3

¹Sommerfleck P, Bernáldez P, Hernández C, Reijtman V, Lopardo H. Otitis media aguda: prevalencia de otopatógenos en pacientes de un hospital público. Acta Otorrinolaringol Esp 2012; 64:12-6.

Otitis media crónica

En la otitis media crónica las bacterias que encontramos con mayor frecuencia son:

- 1) Anaerobios
- 2) *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3) Otros bacilos gram negativos

Estas otitis pueden derivar en meningitis, mastoiditis, etc. La intervención quirúrgica, al eliminar el factor predisponente, generalmente resuelve el problema sin necesidad de recurrir al cultivo. No obstante algunas veces se hace necesario el conocimiento de la microbiota presente.

Sinusitis

Es la formación de una colección purulenta en senos maxilares, frontales, esfenoidales y/o etmoidales.

Toma de muestra

Se efectúa por punción, o mejor, por drenaje quirúrgico de senos paranasales.

Con el líquido obtenido, al igual que para el caso de OMA, se inocula un frasco de transporte anaeróbico (T.A.B., Britania, Buenos Aires), o si no se dispone del mismo, se lo vuelca en un tubo seco estéril de tapa a rosca. La muestra se debe dejar a temperatura ambiente el menor tiempo posible.

Pueden clasificarse en sinusitis aguda y sinusitis crónica.

Las bacterias que podemos encontrar en sinusitis aguda son en orden de frecuencia: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Moraxella catarrhalis*.

En la sinusitis crónica, el predominio es de anaerobios y bacilos gram negativos aerobios.

Cultivo

Con las muestras provenientes tanto de otitis como de sinusitis se debe hacer un extendido con el material original y efectuar una coloración de Gram. Estas muestras se deben sembrar en:

Agar chocolate (incubar a 35° C - 37° C en atmósfera incrementada en dióxido de carbono durante no menos de 3 días).

Agar sangre (incubar al aire a 35° C - 37° C durante 3 días).

Caldo BHI (infusión cerebro corazón). Incubar 7 días.

Agar sangre lacada con vitamina K y hemina (incubar en jarra para anaerobios hasta 10 días).
Caldo anaeróbico (incubar en jarra para anaerobios hasta 10 días).

Bibliografía específica

- Gerber MA.** Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatr Ann* 27: 269-73, 1998.
- Isenberg HD.** Essential procedures for Clinical Microbiology. p.73-80. ASM Press, Washington D.C., 1998.
- Johnson DR, Kaplan EL, Sramek J, et al.** Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. World Health Organization, Geneva, 1996.
- Kellog J.** Suitability of throat cultures procedures for detection of group A streptococci and as reference standards for evaluation of streptococcal antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 28: 165-9, 1992.
- Lopardo G, Calmaggi A, Clara L, et al.** Consenso intersociedades sobre diagnóstico y tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas. *Medicina (Buenos Aires)* 2012; 72: 484-94.
- Lopardo H., Hernández C, Soloaga R.** Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bacterianas. Apuntes de laboratorio N°2. Laboratorios Britania, Buenos Aires, 1999.
- Lopardo H, Hernández C, Morales G.** Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias altas. Módulo del curso a distancia sobre Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología y Colegio Bioquímico de Entre Ríos. 1998.
- Mclsaac WJ, White D, Tannenbaum D, et al.** A clinical score to reduce unnecessary antibiotic use in patients with sore throat. *Can Med Assoc J* 1998; 158: 75-83.
- Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, et al.** Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. I): 1-27.
- Romero J, Betriu C.** Faringitis estreptocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 13: 611-27, 1995.
- Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, et al.** Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012; 55: e86-102.

CAPÍTULO 2

Infecciones respiratorias bajas

Las infecciones respiratorias bajas (IRB), consideradas globalmente, constituyen uno de los problemas infecciosos más frecuentes de la práctica médica.

La vía respiratoria se encuentra fuertemente colonizada en su parte superior, pero desde la laringe hacia la parte inferior sólo está colonizada en pacientes crónicos o intubados.

La microbiota normal del tracto respiratorio superior está principalmente constituida por microorganismos gram positivos. El tratamiento antibiótico, la inmunodepresión, la diabetes, el alcoholismo y la internación en instituciones geriátricas predisponen a la colonización con otros microorganismos más virulentos o más resistentes a los antimicrobianos, especialmente bacilos gram negativos y estafilococos.

Dado que la aspiración es el principal mecanismo por el que las bacterias acceden a los alvéolos, diversa será la etiología de las IRB, según el tipo de paciente de que se trate.

Hay microorganismos que llegan a invadir el tracto respiratorio por inhalación de aerosoles: *Legionella*, *Chlamydia psittaci*, *Aspergillus spp.*, *Coxiella*.

Otros pueden llegar por vía hematógena (menos frecuente). Esta vía se da preferentemente en pacientes hemodializados o en drogadictos endovenosos.

Bronquitis y bronquiolitis

La infección se limita al árbol bronquial y no se producen densidades anormales en la radiografía. Generalmente es de origen viral y no es necesario el estudio bacteriológico. En la primera infancia y en épocas de brote epidémico, es necesario el estudio virológico.

Neumonía

Se designa así a la inflamación del parénquima pulmonar producida por un agente infeccioso, capaz de provocar una densidad radiológica anormal con desaparición del contenido aéreo alveolar.

Existen varias clasificaciones. En este libro consideraremos sólo tres de ellas: según la edad de los pacientes (Tabla 1), según su correlación clínico-radiológica (Tabla 2) y según su forma de adquisición (Tabla 3).

Empiema pleural

Es una complicación de la neumonía. La localización de la infección puede recaer en la cavidad pleural (formada por la pleura, membrana serosa que recubre la superficie de los pulmones). Allí se forma una colección purulenta que por ocupar un espacio preexistente (aunque en forma virtual), recibe el nombre de empiema.

Tabla 1. Agentes causales de neumonía en pacientes de distintas edades

RN ¹ y < 6 meses	6 m - 2 a	>2 a, adolescentes y adultos jóvenes	Adultos mayores	Ancianos
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. pyogenes</i>	Virus respiratorios	<i>S. aureus</i>	Enterobacterias
Enterobacterias	<i>S. aureus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> no capsulados	<i>Pseudomonas</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>M. catarrhalis</i>		Virus respiratorios	Virus respiratorios
Virus respiratorios	<i>H. influenzae</i>			

¹RN: recién nacidos

Tabla 2. Microorganismos esperables según la correlación clínico-radiológica

Típicos: los signos radiológicos están de acuerdo a la gravedad del cuadro clínico	Atípicos: por lo general hay disociación clínico-radiológica
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Chlamydia (Chlamydophila) psittaci</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Legionella</i> spp.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Enterobacterias	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Muestras a procesar

Muestras del tracto respiratorio superior

Sólo son aptos los exudados de fauces para el diagnóstico molecular de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* (Parte III, capítulo 6). Del mismo modo, los aspirados nasofaríngeos deben ser empleados solamente para el estudio de estos mismos agentes, de virus respiratorios o de *Bordetella pertussis* (Parte III, capítulo 2).

Tabla 3. Microorganismos aislados de neumonías de la comunidad, adquiridas en el hospital y por aspiración de secreciones

De la comunidad	Hospitalarias	Aspirativas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores (60 a 80 %)	Anaerobios
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>S. aureus</i> (12 a 15%)	Estreptococos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterococo (poco frecuente)	Grupo ACEK
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus (adenovirus)	Enterobacterias y BGNNF ¹
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Estafilococos
<i>Chlamydia psittaci</i>		
<i>Legionella pneumophila</i>		
Virus (sincicial respiratorio/ influenza y parainfluenza)		

¹BGNNF: Bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa.

Secreciones bronquiales

Esputo (espontáneo o inducido) para gérmenes comunes

1. Recolección de muestra: Se debe retirar la dentadura postiza, si la posee, cepillar la dentadura sin pasta dental. Hacer un buche con agua. Emitir una expectoración bien profunda en un frasco estéril de boca ancha y tapa a rosca (preferentemente la primera expectoración de la mañana).

2. Conservación: Lo ideal es procesar estas muestras dentro de los 30 minutos con un máximo de 2 horas. Si no se puede remitir inmediatamente, conservar a 4°C.
3. Procesamiento: Buscar la porción purulenta o sanguinolenta de la muestra y realizar dos extendidos (a y b). Además, colocar una gota entre un porta y un cubreobjetos (c).

a) Coloración de Gram.

b) Coloración de Ziehl-Neelsen (se realiza igual, aunque la muestra esté destinada sólo al estudio de gérmenes comunes)

c) Observación en fresco.

Con la observación del Gram se hace una evaluación de la calidad de la muestra. Existen distintos criterios. Consideraremos el que tiene en cuenta el número de leucocitos y células epiteliales por campo.

Será una muestra significativa aquella que tenga más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo de 100 X y un microorganismo predominante en la coloración de Gram.

Si tuviera más de 10 células epiteliales y/o menos de 25 leucocitos por campo, se solicita nueva muestra. La excepción es el paciente neutropénico, que no siempre tiene leucocitos en cantidad en el esputo porque tampoco los tiene en circulación.

d) Cultivo.

Se siembra por aislamiento realizando 4 estrías: En agar chocolate, agar sangre y un medio para enterobacterias (CLDE u otro). **No realizar cultivo en medio líquido** por la inexorable contaminación con bacterias de la orofaringe, que se produce en la toma de la muestra.

Se incuba durante 72 h a 35-37°C. El agar chocolate se incuba en la atmósfera enriquecida con CO₂ (jarra y vela o estufa gaseada).

Jerarquizar los microorganismos que crezcan más allá de la tercera estría y que se correlacionen con los observados en el examen directo.

Se realizará la coloración de Gram de las colonias, las pruebas de identificación y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos que correspondan.

Algunos gérmenes deben ser considerados siempre patógenos, independientemente del tipo y calidad de las muestras: *Mycobacterium tuberculosis*, hongos como *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* (no en la Argentina), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp., *Legionella* spp., virus respiratorios estacionales, protozoarios y helmintos. Para todos ellos se deben realizar procedimientos especiales de diagnóstico que no entran en la rutina del esputo para gérmenes comunes.

La importancia de patógenos potenciales deberá ser evaluada según el tipo y calidad de muestra, desplazamiento o no de la microbiota habitual de las vías aéreas superiores (en la coloración de Gram y en las placas de cultivo), datos clínicos, radiológicos e histopatológicos.

Los agentes etiológicos en general se encuentran en concentraciones superiores a 10⁶ UFC/mL. Este es el fundamento de las técnicas cuantitativas y semicuantitativas.

El procedimiento para la investigación de micobacterias (principalmente bacilo de Koch) se verá en la Parte IV, capítulo 3.

Aspirado traqueal

Es la muestra más sencilla de obtener en pacientes en asistencia respiratoria mecánica, pero, si bien tiene una sensibilidad adecuada (80–85%), su baja especificidad (30–35%) hace que su valor sea relativo. En consecuencia, puede inducir a un falso diagnóstico de neumonía o a un diagnóstico etiológico erróneo.

La muestra se debe enviar en tubos estériles con tapa a rosca. Es imprescindible que se indique la sospecha clínica. Se la mantiene a temperatura ambiente el menor tiempo posible y se envía al laboratorio.

Se mezcla con volúmenes iguales de ditiotreitol o N-acetilcisteína, se agita en vórtex y 100µl se mezclan con 9,9 ml de solución fisiológica. Se hacen diluciones seriadas y se siembra 0,1 ml de cada dilución en CLDE, agar sangre y agar chocolate.

Se considera que un recuento de colonias es significativo cuando supera las 100 ufc en las placas (10^5 ufc/ml de secreciones).

Muestras broncoscópicas

El 100% de las muestras tomadas con broncoscopio estarían contaminadas con gérmenes de la microbiota orofaríngea si no se realizaran las técnicas adecuadas. La utilidad de las distintas técnicas broncoscópicas se detallan en la Tabla 4.

Lavado bronquial

El lavado bronquial se realiza para eliminar las secreciones en los pacientes con vía aérea artificial. El médico inyecta solución salina a través de broncoscopio en el pulmón y después lo vuelve a succionar. Estas muestras, por no estar tomadas de forma protegida, solo se deben utilizar para el diagnóstico de patógenos respiratorios indudables (que no son colonizantes de la vía aérea) como *Legionella*, *Chlamydia* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (ver Tabla 4).

Técnica del catéter protegido

Se trata de un sistema de doble catéter, con cánulas telescópicas y un tapón distal de *carbowax*. Una vez llegado al sitio indicado, se avanza con la cánula interna, el tapón se expulsa hacia el lumen de las vías aéreas y se avanza con el cepillo para tomar las secreciones bronquiales (aproximadamente 0,01 ml). Se retrae el cepillo y se lo retira a través de la cánula. Se corta el cepillo y se lo coloca en un tubo con 1 ml de caldo de cultivo o solución fisiológica.

Luego la muestra se agita en un vórtex durante 2 a 3 minutos, se toman 50 µL y se siembran en agar sangre, agar chocolate, CLDE y agar para anaerobios. Luego, se efectúa una dilución 1/10 de la muestra agitada y se siembran 10 µL en los mismos medios.

El resultado del recuento de colonias multiplicado por la dilución (10^5) tiene que ser mayor de 10^6 ufc/ml para ser considerado como significativo (>10 colonias en las placas).

Tabla 4. Utilidad relativa de los distintos procedimientos broncoscópicos

Tipo de muestra	Tipo de infección	Acciones sugeridas
Lavado bronquial	Neumonías producidas por patógenos estrictos (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Legionella</i> spp. hongos endémicos)	Utilizar los medios adecuados para cada tipo de microorganismo sospechado
Cepillo protegido	Útil para neumonía bacteriana	Realizar cultivo cuantitativo
Lavado broncoalveolar	Util para todos los casos	Realizar cultivo cuantitativo Utilizar los medios adecuados para cada tipo de microorganismo sospechado

Lavado broncoalveolar

Es imprescindible que se indique la sospecha clínica. Se introduce el broncoscopio y se lava con 100 ml de solución fisiológica estéril. Se aspira y se envía en tubo estéril con tapa a rosca. Se conserva a temperatura ambiente el menor tiempo posible y se envía al laboratorio. Si no se realizara con catéter protegido, la muestra se contaminaría con parte de la microbiota orofaríngea habitual.

La muestra se agita en vórtex y se separan dos alícuotas de 10 ml cada una. Una de ellas se centrifuga a 1.000 rpm por 10-20 minutos y el sedimento se utiliza para realizar una observación en fresco, y las coloraciones (Gram, Ziehl Neelsen). La otra se diluye 1/10 y 1/100 y se efectúa la siembra de 0,1 ml en agar sangre, CLDE y agar chocolate. El punto de corte para considerar que un hallazgo es significativo es de 10^5 ufc/ml de secreciones (10 ufc en las placas sembradas con la dilución 1/10).

Biopsia de pulmón a cielo abierto

Se toma la muestra por cirugía. Se deberá evaluar el riesgo-beneficio, debido a que es un procedimiento invasivo y que pone en riesgo la vida del paciente. La siembra se realiza como se efectúa con toda muestra de biopsia: se homogeneiza en mortero con gotas de solución fisiológica estéril si fuera necesario, se siembran placas de agar sangre, agar chocolate, caldo tioglicolato, agar y caldo para anaerobios y medios para hongos y micobacterias, que serán incubados a 28°C y a 37°C. Se realizan también las coloraciones adecuadas.

Punción pleural

Obviamente esta punción solo se realiza cuando hay derrame pleural.

Se efectúa la punción a través de la pleura con aguja gruesa o trócar y se logra el drenaje del líquido pleural, el que se introduce en un frasco T.A.B. o en un tubo seco con tapa a rosca. La conservación se realiza a temperatura ambiente durante el menor tiempo posible.

La siembra se efectúa de igual modo que para el caso de la biopsia de pulmón, prestando atención al diagnóstico presuntivo y a las coloraciones y exámenes en fresco, para elegir los medios adecuados. Cualquier desarrollo resulta significativo.

Punción pulmonar transcutánea

Es una simplificación de la biopsia a cielo abierto, que se puede realizar si la infección estuviera muy localizada. Debe hacerse con control radioscópico. El procesamiento es el mismo que para la biopsia de pulmón.

Hemocultivos

Deben realizarse en caso de diagnóstico clínico-radiológico de neumonía. Tienen baja sensibilidad pero el hallazgo de patógenos respiratorios en estas muestras, en pacientes que no tengan otra puerta de entrada, tiene valor diagnóstico. Para el procesamiento de los hemocultivos véase la el capítulo 5 de la Parte IV.

Bibliografía específica

Lopardo H., Hernández C, Soloaga R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bacterianas. Apuntes de laboratorio N°2. Laboratorios Britania, Buenos Aires, 1999.

Sharp SE, Robinson A, Saubolle M, Santa Cruz M, Carroll K, Baselski V. Lower Respiratory Tract Infections. Sharp SE (coordinating ed.). Cumitech 7B, ASM Press, Washington, D.C. 2004.

Soloaga R y col. Neumonía nosocomial: diagnóstico bacteriológico. Infectol & Microbiol Clín 1995; 7:144-161.

CAPÍTULO 3

Investigación del bacilo de Koch

Preparación del área de trabajo y normas de bioseguridad

Recomendaciones generales

Antes de comenzar la tarea:

1. Preparación del área de trabajo: Colocar sobre la mesada una hoja doble de periódico humedecida con fenol al 5% y sobre ella un mechero tipo Bunsen (mejor un quemador eléctrico).
2. Protegerse con un delantal sobre el guardapolvo y un barbijo adicionado con tres capas de gasa en su interior o un barbijo especial.
3. Lavarse las manos y usar guantes.
4. Durante las tareas:
5. Si por cualquier causa se debe abandonar el lugar de trabajo, deben quitarse los elementos protectores: barbijo y delantal, los cuales volverán a colocarse al ingresar al mismo.
6. Lavarse frecuentemente las manos y usar guantes.
7. Una vez terminada las tareas:
8. Descartar para su esterilización los materiales procesados y utilizados, incluso el papel del área de trabajo.
9. Desinfectar la mesada con fenol al 5%.
10. Quitarse el barbijo y sumergirlo en lavandina al 5%.
11. Quitarse el delantal y los guantes.
12. Lavarse las manos.

NOTA: Los laboratorios que efectúan cultivo, deberán contar con cámaras de seguridad de tipo II con salida filtrada al exterior.

Espuito

Toma de muestra

Se deben obtener al menos tres muestras en días consecutivos (primer esputo de la mañana, porque las secreciones se acumulan durante las horas de reposo). Estas muestras deben recogerse en frascos de boca ancha estériles y con tapa a rosca. Deberán contener secreciones bronquiales. La saliva, aspirado nasofaríngeo o traqueal no son muestras válidas.

Conservación

Las muestras de esputo deben conservarse en heladera (4°C) hasta su entrega al laboratorio.

Examen microscópico directo

Preparación del extendido

Seleccionar con el ansa la partícula útil de la muestra y extenderla sobre las dos terceras partes del portaobjetos. La partícula útil es la más densa o purulenta de la muestra y debe extenderse presionando el ansa sobre el portaobjetos en forma rotativa hasta lograr un extendido uniforme.

Una vez seco, fijar cada portaobjetos mediante dos o tres pasajes rápidos sobre la llama del mechero, con el extendido hacia arriba, cuidando de no calentar demasiado.

Coloraciones

Si se dispone de microscopio de fluorescencia, se puede realizar la tinción fluorescente de auramina-rodamina o auramina sola. La ventaja de esta coloración es que se puede barrer un mayor número de campos en menos tiempo que con la tinción de Ziehl-Neelsen, porque puede hacerse la observación con un aumento de 400X. Además, una vez identificado el presunto microorganismo, pueden tomarse las coordenadas del microscopio, teñirse con Ziehl-Neelsen y confirmar el hallazgo. Esto se realiza de esta manera porque el de auramina es un método muy sensible pero no tan específico, y se pueden confundir bacilos ácido-alcohol resistentes con artefactos (Apéndice I).

Tinción de Ziehl-Neelsen

Cubrir toda la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada.

Con la llama de un hisopo humedecido en alcohol, calentar suavemente por debajo de las láminas cubiertas con fucsina, hasta que se produzca emisión de vapores blanquecinos visibles. Dejar de calentar y repetir el procedimiento dos veces más.

Importante: En ningún caso la fucsina debe hervir o secarse sobre las láminas. Si disminuye por evaporación o derrame, hay que reponerla. Esta operación dura aproximadamente 20 minutos.

Eliminar la fucsina lavándola con agua corriente.

Decoloración:

Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con la mezcla alcohol-ácido. Mover suavemente en forma de vaivén para que se vaya produciendo la decoloración. Repetir hasta que las partes más gruesas conserven un leve tono rosado. Esta operación requiere alrededor de 2 minutos.

Lavar con agua corriente.

Coloración de fondo:

Cubrir durante 1 minuto la totalidad de la superficie del extendido con la solución de azul de metileno.

Lavar con agua corriente

Colocar las láminas ya teñidas verticalmente, con el extendido hacia arriba, en una repisa, para que se sequen a temperatura ambiente.

Observación microscópica:

La observación microscópica debe establecer, en primer término, si se encuentran o no bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el extendido y, si los hay, el número promedio observado aproximadamente por campo del microscopio observado.

Importante: Se considera campo útil aquel en el cual se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas). Los campos en que no aparecen elementos no deben contabilizarse.

El número de campos que se deberá observar variará según la cantidad de bacilos que tenga la muestra:

- a) Deben observarse por lo menos 100 campos útiles.
- b) Si se encuentran de 1 a 10 BAAR por campo de promedio, es suficiente observar 50 campos.
- c) Si se encuentran más de 10 BAAR por campo de promedio, basta con la observación de 20 campos.

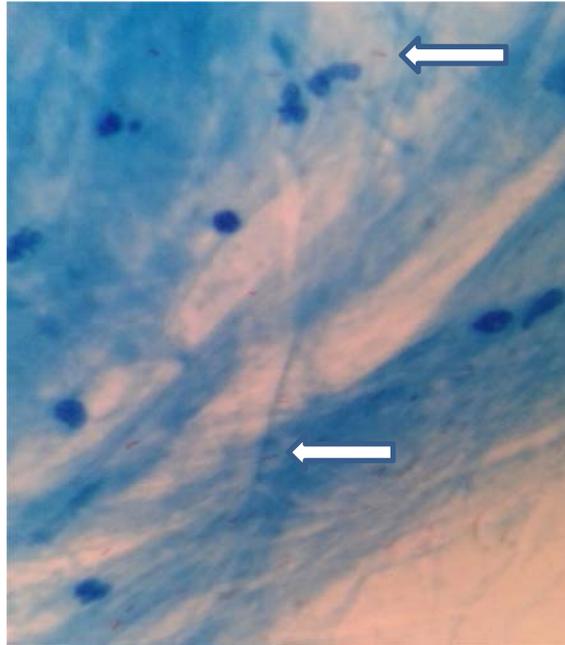


Figura 1. Muestra de esputo con tinción de Ziehl-Neelsen positiva ++

Informe de resultados:

Negativo (-): No se observan BAAR en 100 campos.

Positivo (+): Menos de 1 BAAR por campo en 100 observados.

Positivo (++) : De 1 a 10 BAAR por campo de 50 observados.

Positivo (+++) : Más de 10 BAAR por campo en 20 observados.

Nota: Cuando se observa la coloración de un material homogeneizado positivo, no se consigna el número de bacilos; sólo se informa que se observan BAAR.

Otras muestras

1. Contenido gástrico

Se efectúa en pacientes que no pueden expectorar.

Se deben tomar tres muestras en días consecutivos por sondaje gástrico, con el paciente en ayunas.

Se realiza el lavado gástrico con solución fisiológica o agua estéril y este material se vuelca en un recipiente estéril de boca ancha y tapa a rosca (por ejemplo, frasco de urocultivo).

Deben procesarse inmediatamente. Si se procesan en diferido, deben neutralizarse con NaOH al 4% y conservarse en heladera el menor tiempo posible. Las muestras se centrifugan a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos. La parte que debe tratarse es el sedimento mucoso o purulento. Homogeneizar con NaOH 4%, como si se fuera a cultivar una muestra de esputo (ver más adelante). En el momento de la siembra, depositar una gota del material neutralizado en un portaobjetos para su coloración (previo fijado) y posterior observación.

2. Orina

Se deben solicitar tres muestras (primera micción de la mañana de tres días consecutivos). Las mismas se recolectarán en forma aséptica en frascos de boca ancha y tapa a rosca. Estas muestras, como las de esputo, pueden conservarse en heladera a 4°C.

Deben centrifugarse a 3000 r.p.m. durante 30 minutos y con el sedimento se procede igual que el caso anterior.

3. Líquidos de punción

Se deben recoger en tubos secos y estériles con tapa a rosca. No se deben utilizar tubos con heparina ya que ésta puede inhibir el desarrollo. La muestra remitida en dicha forma, debe mantenerse a temperatura ambiente durante el menor tiempo posible.

Los líquidos de punción son frecuentemente paucibacilares (pocas unidades formadoras de colonias por ml), salvo algunas excepciones como la de la Fig 2. Por ello es que la positividad de la tinción de Ziehl-Neelsen, es frecuentemente negativa (menos del 10% de los casos).

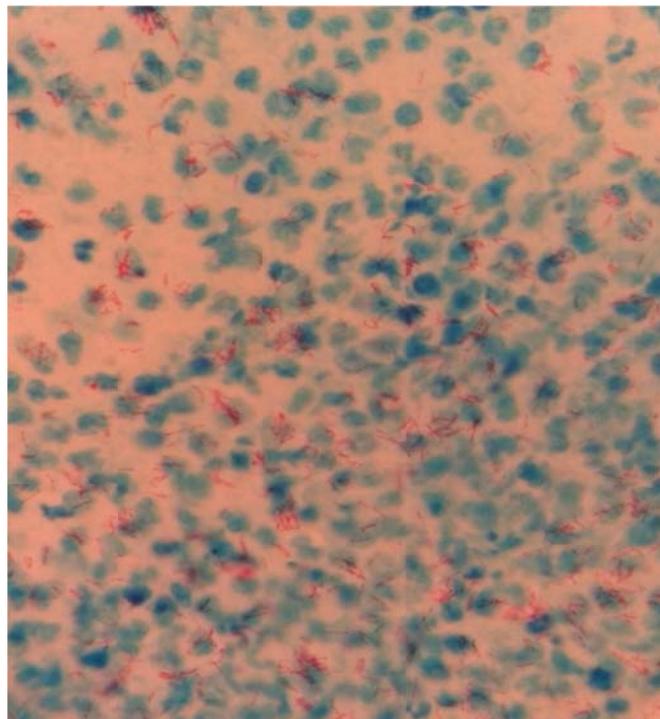


Fig. 2. Líquido pericárdico, con abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes

Se centrifugan durante 30 minutos a 3.000 r.p.m. Con el sedimento se efectúa una siembra directa siguiendo las indicaciones de cultivo. La otra parte del sedimento debe homogeneizarse y continuar, como en los casos anteriores, aunque en este caso una alícuota se siembra directamente y otra se descontamina con NaOH y se siembra por separado.

4. Piezas de cirugía

Se deben elegir las porciones que contienen alguna sustancia caseosa. Con instrumental de cirugía, pasarlas a un mortero con arena estéril y disgregarlas. Se transfieren a un tubo con pipeta Pasteur y propipeta. Cuando la pieza es pequeña (ganglios, por ejemplo) se disgrega en su totalidad. Se procede como en casos anteriores. Aunque en este caso, como en el de los líquidos de punción, una alícuota se siembra directamente y otra se descontamina con NaOH y se siembra por separado.

5. Materiales altamente contaminados en general: (materia fecal, sangre menstrual, etc.)

Se tratan igual que el esputo para descontaminar y se procesan igual que el resto de las muestras.

6. Lavados bronquiales y broncoalveolares

Se deben enviar en tubo estéril con tapa a rosca.

Al enviar todas estas muestras, es imprescindible que el médico indique la sospecha clínica y el pedido expreso de procesamiento para estudio de micobacterias.

Se tratan igual que el esputo para descontaminar y se procesan igual que el resto de las muestras.

7. Hemocultivos para micobacterias

Se extraen entre 2 y 5 ml de sangre en condiciones de esterilidad y se introducen en frascos especiales con medio líquido para micobacterias.

Se deben tomar, por lo menos, dos muestras de hemocultivo, en distintos tiempos y de venas diferentes.

Cultivo

Homogeneización

Colocar, aproximadamente, 3 ml de la muestra en un tubo de centrifuga y agregar igual cantidad de solución de NaOH al 4%. Llevar a estufa de 37°C durante 30 minutos. Puede dejarse más tiempo, si es necesario, hasta la homogeneización total.

Centrifugación

Se realiza durante 30 minutos a 3.000 r.p.m. en centrifuga, especialmente diseñada para evitar la liberación de aerosoles. Luego se descarta el sobrenadante en un frasco de boca ancha con un embudo, para evitar las salpicaduras. Se deja reposar 5 minutos, para que se asienten los aerosoles.

Neutralización

El sedimento se trata con solución de ácido sulfúrico 1N (5%) hasta la neutralidad con azul de bromotimol u otro indicador adecuado.

Cultivo propiamente dicho

1. En medio sólido

Siembra: Colocar aproximadamente 0,2 ml del sedimento neutralizado en cada uno de los medios (Lowenstein-Jensen y Stonebrink). Incubar con los tapones flojos (tapa a rosca) o, directamente, si se trata de tapón de algodón, durante 24-48 horas a 37°C, hasta que se haya evaporado todo el líquido. Luego ajustar el tapón a rosca, o quemar, si se utilizara tapón de algodón, introducir el resto de algodón no quemado en el tubo y tapar con tapón de goma estéril.

Incubación: Hasta 60 días, a 37°C, con observación diaria del desarrollo durante la primera semana [para ver contaminación o micobacterias de crecimiento rápido (de 3 a 5 días)] y luego en forma semanal.

Resultado: Ante la aparición de colonias, confirmar microscópicamente la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

2. En medio líquido: Se inoculan tubos de caldo 7H9 o 7H10 con 0,2 ml del sedimento neutralizado y se visualiza el desarrollo, con observación diaria durante la primera semana, y luego semanalmente. Si se emplean métodos automatizados de lectura continua, se inocula el frasco y se espera la señal del aparato. Ante un resultado positivo de cualquiera de las dos modalidades, se realizan coloraciones de Gram (para ver contaminantes) y Ziehl Neelsen (para ver BAAR) y subcultivos en medios sólidos.

Inoculación al cobayo

Se trata de un método cruento actualmente en desuso por los riesgos para el operador y por requerirse del sacrificio de animales. Se reserva para estudios de investigación, previa aprobación de un comité de ética.

Se realiza inoculando por vía intraperitoneal o intratesticular a un cobayo, a partir del sedimento neutralizado. Se observa la aparición de ganglios infartados cercanos al punto de inoculación, dentro de los sesenta días de realizada la inyección del material. En caso positivo, se sacrifica el animal y se extraen muestras del ganglio, en las que se investiga la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Pruebas bioquímicas para identificación de micobacterias (ver Apéndice III)

CAPÍTULO 4

Diagnóstico microbiológico de la infección urinaria

Patogenia de las infecciones urinarias

Las vías que pueden utilizar los microorganismos para acceder al tracto urinario son tres: la vía canalicular ascendente, la vía descendente o hematógena y la vía linfática.

La vía linfática es una vía que posiblemente puedan utilizar microorganismos alojados en el intestino, porque de hecho hay conexión con la vía urinaria a través de los vasos linfáticos, pero aún no ha sido fehacientemente comprobada.

La vía hematógena es la utilizada por microorganismos que previamente llegaron a la sangre desde algún otro sitio y que invaden el riñón al nivel de los glomérulos. La tuberculosis renal es el ejemplo más gráfico, aunque la infección producida tenga características atípicas. Otro microorganismo que con frecuencia accede de este modo a la vía urinaria es *Staphylococcus aureus*.

La vía canalicular ascendente es la más frecuentemente utilizada. Los microorganismos colonizan la zona perineal a partir de su hábitat natural, que es el intestino humano. Desde allí, por diversos factores que dependen del hospedador y del microorganismo, pueden alcanzar la vejiga atravesando la uretra en contracorriente.

Considerando a un paciente previamente sano, los factores relacionados con el microorganismo tienen que ver con su prevalencia en la zona perineal y con su aptitud para llegar a la vejiga. Los autores que proponían que los microorganismos que se encontraban en mayor concentración en materia fecal eran los que llegaban más frecuentemente a la vía urinaria, no tuvieron en cuenta dos hechos: (1) los anaerobios superan en materia fecal en más de 100 o 1.000 veces a los facultativos, sin embargo la infección urinaria (IU) primaria aguda por anaerobios es inexistente; (2) si bien *Escherichia coli* es el microorganismo prevalente en IU, su relación con la producida por *Proteus mirabilis* es de aproximadamente 10:3, en cambio, en materia fecal, ésta relación es de 100:1. Esto quiere decir que *P. mirabilis* tiene factores que lo hacen más apto para producir IU.

Los factores que dependen del microorganismo son varios. Entre ellos, contamos a los antígenos de superficie (somático O o capsular K). Determinados serotipos de *E. coli* son los más frecuentes en IU. Estos pueden facilitar la adherencia. No obstante, los factores de adherencia más importantes son las fimbrias. Las de tipo 1 les permiten a las bacterias adherirse a la mucosa uretral y a la superficie de la piel. A las de tipo 1 se las conoce como manosa-sensibles, porque el agregado de este azúcar

impide la adherencia de estas fimbrias a sus receptores celulares. A las de tipo 2, por el contrario, se las denomina manosa-resistentes. Las bacterias pueden desplegar distintos tipos de fimbrias según su fase de desarrollo. En fase logarítmica se generan las de tipo 1. De este modo, las bacterias se adhieren a la mucosa uretral y a través de factores mecánicos ascienden en contracorriente. Llegan a la vejiga y allí se replican en la orina, como si ésta fuera un medio de cultivo, hasta llegar a fase estacionaria. Aquí aparecen las fimbrias de tipo 2 que son capaces de adherirse a la mucosa vesical.

Aspectos epidemiológicos y microbiológicos de la infección urinaria

Después de las infecciones respiratorias, la infección urinaria (IU) es la infección que con más frecuencia ocurre en el hombre. Puede afectar tanto a pacientes internados, como a pacientes ambulatorios. Esta patología se presenta en niños y adultos y alcanza su mayor prevalencia en las mujeres jóvenes. Se calcula que a la edad de 32 años, la mitad de las mujeres han tenido al menos un episodio de IU. Solamente en los primeros tres meses de vida hay una mayor predisposición en individuos del sexo masculino. Aumenta también la frecuencia en hombres mayores de 50 años por causa del componente prostático y en cualquier enfermo con factores urológicos predisponentes.

La incidencia de IU es mayor en el primer año de vida (1%), pero decrece especialmente en los varones, después de la primera infancia. Algunas complicaciones como la hipertensión, las cicatrices renales y la insuficiencia renal crónica, estarían asociadas a IU previas.

El sobrediagnóstico induce a la utilización de procedimientos invasivos, como la cistouretrografía. Los resultados falsamente negativos, por otra parte, pueden conducir a complicaciones indeseables.

La infección urinaria durante el embarazo es una de las complicaciones infecciosas más frecuentes durante la gestación. El mayor riesgo comienza a la sexta semana de edad gestacional y tiene su pico máximo entre las 22 y 24 semanas. Estas infecciones pueden conducir a complicaciones tanto para la mujer como para el feto o el recién nacido (pielonefritis posparto, mayor mortalidad fetal, prematuridad y bajo peso al nacer). Entre el 2% y el 7% de las embarazadas desarrollan bacteriuria asintomática. La bacteriuria asintomática es comúnmente definida como la presencia de $\geq 10^5$ ufc/mL en dos muestras de urocultivo tomados en forma consecutiva, con sedimento de orina normal o patológico, en pacientes asintomáticas. Sin tratamiento antibiótico, cerca del 30% conducen a cistitis y entre el 30 y el 50% desarrolla pielonefritis, con lo que se aumenta el riesgo de tener un parto prematuro o un recién nacido de bajo peso.

La prevalencia relativamente alta de bacteriuria durante el embarazo y la morbilidad que puede producir durante el curso del mismo, sumadas al impacto positivo del tratamiento, justifica su búsqueda sistemática en toda mujer embarazada.

Las IU en hombres jóvenes no son frecuentes y siempre se consideran complicadas. En varones mayores, es frecuente el compromiso prostático y la frecuencia de la IU se equipara a la de las mujeres arias.

Las IU suelen ser las causas más frecuentes de infección nosocomial en los adultos (40%) y en un 80% están relacionadas con la colocación de un catéter para drenaje vesical en forma permanente. Son de difícil prevención cuando el catéter permanece emplazado por un período prolongado y constituyen una causa importante de bacteriemia en los pacientes internados.

Cuadro 1. Protocolo de pedido de muestras destinadas al diagnóstico microbiológico de la infección urinaria

Nombre y apellido del paciente		Fecha		Hora de recolección	
Edad		Sexo		No. de historia clínica	
Tipo de muestra: urocultivo					
Modo de obtención de la muestra					
Síntomas					
Enfermedad de base					
Administración previa de antibióticos (cuáles)					
Observaciones					
Búsqueda de gérmenes comunes	Búsqueda de micobacterias	Búsqueda de hongos	Hora de recepción	Hora en que se sembró	

Toma de las muestras

1. Niños que controlan esfínteres

La muestra de elección es el chorro medio miccional. El tiempo de retención deseado es de, por lo menos, 3 horas.

Niñas: Se debe higienizar la zona genital con agua y jabón, de adelante hacia atrás, secar con toalla limpia. Se elimina el primer chorro (10 ml) y se recolecta en frasco estéril de boca ancha la fracción siguiente (10-20 ml). Se recomienda orinar separando los labios mayores.

Niños: Se debe retraer el prepucio e higienizar el glande y el surco balanoprepucial con agua y jabón. Luego se deberá secar con una toalla limpia. Se elimina el primer chorro (10 ml) y se recolecta en frasco estéril de boca ancha la fracción siguiente (más de 20 ml).

Se desaconseja el uso de antisépticos, ya que pueden afectar el resultado del urocultivo, provocando un descenso en el recuento de colonias.

2. Niños que no controlan esfínteres

Nunca utilizar bolsas colectoras para el estudio de urocultivo. Su especificidad es muy baja (62%)

Toma al acecho

Este método se aplica con los lactantes y es similar al descrito para los pacientes que controlan esfínteres. Higienizar los genitales externos con agua hervida y enfriada y una pastilla nueva de jabón. Enjuagar. **No utilizar desinfectantes.** Se deberá esperar entonces a que el paciente orine y se recogerá en un frasco estéril de boca ancha la porción media del chorro miccional. Su especificidad es de aproximadamente 80%.

Punción suprapúbica

Este procedimiento deberá ser efectuado por médicos entrenados. Se reserva para casos especiales, como neonatos graves, pacientes cuyos urocultivos previos presenten resultados conflictivos, sospecha de microorganismos de difícil desarrollo, entre otros. Primeramente, se verifica que el paciente presente un globo vesical palpable, se desinfecta la zona pubiana con solución antiséptica de iodopovidona o clorhexidina y se deja actuar un minuto, se limpia con alcohol al 70% y se punza con aguja adecuada en la zona ubicada a 1 o 2 cm por encima de la sínfisis pubiana. Se aspira la orina y se vuelca en frasco estéril. Si se realiza correctamente la desinfección de la zona de punción, la especificidad es mayor al 99%.

Cateterización

La cateterización vesical es el método de elección para pacientes en los que habitualmente se practica el cateterismo intermitente (enfermos con vejiga neurogénica a quienes se debe vaciar periódicamente el contenido vesical). En algunos centros lo utilizan para lactantes, en lugar de la toma al acecho, ya que presenta la ventaja de ser una toma más rápida y confiable, cuando se realiza por personal entrenado. Sin embargo, presenta el riesgo de producir el ascenso de los microorganismos desde la uretra a la vejiga y generar así una IU iatrogénica. Para efectuar este

método, se desinfecta la zona perineal, se introduce la sonda por la uretra y se recoge la porción media del chorro de orina, que sale por la sonda. Su especificidad es del 97%.

3. Mujeres adultas

La muestra de elección es el chorro medio miccional. El tiempo de retención deseado es de, por lo menos, 3 horas. Se debe higienizar la zona genital con agua y jabón, de adelante hacia atrás, secar con toalla limpia y colocar un tapón vaginal. Se elimina el primer chorro (10 ml) y se recoge en frasco estéril la fracción siguiente (≥ 20 ml). Se recomienda orinar separando los labios mayores.

En ancianas y en embarazadas asintomáticas, conviene tomar más de una muestra para tener seguridad del grado de significación de los hallazgos.

4. Varones adultos

La muestra de elección también es el chorro medio miccional. El tiempo de retención deseado también es de, por lo menos, 3 horas. Se debe retraer el prepucio e higienizar el glande y surco balanoprepucial con agua y jabón. Al comenzar a orinar, se elimina el primer chorro (10 ml) y se recolecta en frasco estéril la fracción siguiente (≥ 20 ml).

5. Pacientes con sonda permanente

Punción de la sonda

Este procedimiento se utiliza en aquellos enfermos con sonda permanente en los que no es posible retirar o reemplazar la sonda. Se obtura la sonda con una pinza *ad hoc*. Se espera unos minutos, se desinfecta la parte externa de la sonda en la zona proximal, con alcohol yodado o iodopovidona, y se punza la sonda con aguja y jeringa estéril. Se vuelca el contenido en forma aséptica en un frasco estéril. Debe tenerse en cuenta que las muestras de orina de pacientes con sondas colocadas durante más de tres días, estarán inevitablemente colonizadas por una microbiota frecuentemente polimicrobiana.

Recolección a través de una sonda estéril recién colocada

Aprovechando la colocación o el cambio de sonda, se recoge directamente la orina por goteo en un frasco estéril. Si se trata de un recambio de sonda, es posible que se produzca la resuspensión de bacterias de la zona uretral o colonizantes de la sonda anterior en la orina vesical. Esto puede dar lugar a cultivos falsamente positivos. Para evitar esto se puede descartar una primera porción de orina y luego efectuar la toma de la muestra.

Conservación y transporte de las muestras

Las muestras para urocultivo deben refrigerarse a 4-8°C (heladera), inmediatamente después de recolectadas. Si el traslado al laboratorio demora más de 30 minutos, los frascos deben transportarse dentro de un contenedor con hielo. Las muestras pueden conservarse en la heladera de forma inalterable durante al menos 24 horas.

Procesamiento

La interpretación del urocultivo se realiza en base a que los recuentos de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml), a partir de muestras de orina, son normalmente mayores cuando las bacterias están produciendo IU, que cuando se trata de colonizantes o contaminantes de la zona periuretral arrastrados por la orina. Esta diferencia además puede aumentarse si se permite que las bacterias puedan replicarse dentro de la vejiga del paciente al cumplir un tiempo de retención urinaria de más de tres horas. Es importante enfatizar entonces, que el estudio para descartar o documentar una bacteriuria significativa (ver definición), debiera, al menos, incluir el cultivo semicuantitativo de la orina, como así también pruebas complementarias, entre las cuales, la más importante es la observación del sedimento urinario.

Pruebas complementarias

I- *Sedimento urinario*

Para realizar la observación del sedimento urinario, se toman entre 5 y 10 ml de orina en un tubo cónico y se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se vuelca el sobrenadante, de modo que quede aproximadamente 0,5 ml del sedimento. Se resuspende por agitación, en ese volumen de líquido, y se observa entre porta y cubreobjetos, en microscopio, con un aumento de 400X. Se deberá consignar la presencia de leucocitos, hematíes, bacterias, cilindros (especialmente leucocitarios), tipo de cristales y tipo de células. Se promediará el número por campo de leucocitos, hematíes y células para informar el recuento respectivo.

Desde el punto de vista infectológico, se considera que un sedimento de orina no es normal cuando una gota del centrifugado de 10 ml (10 min. a 2.000 rpm) contiene más de 5 leucocitos por campo de 400X.

II- *Coloración de Gram*

Los laboratorios que reciben un número apreciable de muestras no realizan la coloración de Gram de muestras de orina en forma rutinaria. Sí se debe realizar a demanda de los médicos tratantes o en casos que lo justifiquen, según el criterio del supervisor o del operador.

La presencia de al menos un microorganismo por campo de 1.000X, en la coloración de Gram de una gota de orina sin centrifugar, se correlaciona con un cultivo de más de 10^5 ufc/ml. Sin embargo, este procedimiento carece de sensibilidad, puesto que se está trabajando en el límite de detección del microscopio óptico (1.000X) y del método, ya que la observación de una sola bacteria se correlaciona con recuentos $>10^5$ ufc/ml. Además de lo tedioso que resulta recorrer muchos campos antes de descartar una muestra como negativa, actualmente se sabe que muchas infecciones urinarias cursan con recuentos $\leq 10^4$ ufc/ml (ver más adelante). Por otra parte, la presencia de gérmenes contaminantes no puede inferirse en todos los casos mediante esta metodología. No obstante, la coloración de Gram constituye un buen control de calidad del sedimento y del cultivo e incluso puede aumentar la sensibilidad y la especificidad del sedimento si se los evalúa en conjunto. El Gram también puede ser de gran utilidad para la documentación rápida de bacteriuria significativa, con la consiguiente orientación adicional sobre el tipo de microorganismo involucrado en algunos casos particulares de pacientes sintomáticos o de alto riesgo, en los que el médico quiera adoptar una terapéutica antimicrobiana precoz.

Finalmente, se recomienda la realización de una coloración de Gram de la orina en (i) pacientes que están recibiendo antibióticos y (ii) pacientes que presentan sedimento patológico con cultivos negativos, para verificar la presencia de microorganismos exigentes. En este sentido, en casos reiterados, debe considerarse además la realización de una coloración de Ziehl-Neelsen del sedimento de la orina, aunque su sensibilidad en casos de tuberculosis renal es inferior al 10%.

III. Tiras reactivas (esterasa leucocitaria y nitritos)

Son parte de las pruebas incluidas en las tiras reactivas para análisis de orina. La esterasa leucocitaria es un indicador indirecto de la presencia de leucocitos y la prueba de nitritos detecta a estas sustancias, que habitualmente resultan de la degradación de los nitratos urinarios por parte de las bacterias. Su sensibilidad es baja ya que detecta la presencia de más de 10^6 ufc/ml del microorganismo que pudiera estar en la orina. Por otra parte, la presencia de nitratos en la orina depende de la dieta y hay microorganismos incapaces de reducir los nitratos. Su combinación puede ser de utilidad como pruebas de *screening* en poblaciones de baja prevalencia (Tabla 1).

IV. Toma de pH

Se efectúa con tiras reactivas a partir de la orina, previa centrifugación.

Cultivo

La siembra se efectúa con ansa calibrada de 5-10 μ L, descargando una gota de orina sobre cada una de las placas utilizadas, y diseminando en la mitad de las mismas, para efectuar el recuento de

colonias. Sin quemar el ansa, se hacen estrías por dos veces, en la otra mitad, para realizar el aislamiento de colonias (Fig. 1).

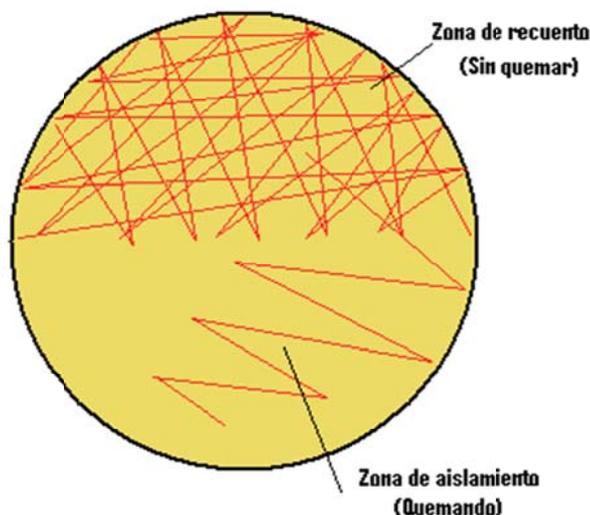


Figura 1. Esquema de la siembra de urocultivos

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio en el diagnóstico de IU en niños (modificada de Gorelik y Shaw 1999)

Prueba	Sensibilidad %	Especificidad %
Nitritos	50	95-100
Esterasa leucocitaria	83	84
Esterasa leucocitaria y/o nitritos	71-100	93
Sedimento urinario (≥ 5 leucocitos/campo)	55-88	79
Recuento en cámara (≥ 10 leucocitos/mm ³)	57 -92	89
Gram de la orina sin centrifugar	93	95
Gram y sedimento +	75-88	99
Gram o sedimento +	95	89

Es posible la realización de siembras en media placa teniendo las precauciones del caso.

En distintos laboratorios se utilizan diferentes esquemas: Los más usados rutinariamente son: (1) Siembra sólo en CLDE; (2) siembra en agar MacConkey + agar sangre. Para pacientes con patología urológica, los medios elegidos son CLDE y agar chocolate, para embarazadas CLDE + agar sangre.

El CLDE puede reemplazarse por un medio cromogénico.

Si se utiliza agar MacConkey o EMB es imprescindible el agregado de agar sangre o agar chocolate. Este último, como se dijo, se reserva para pacientes urópatas o portadores de patología urológica. Las muestras de orina se emplean para cargar los tubos destinados a la observación del sedimento o para cargar las cámaras de Neubauer en caso de que el volumen sea insuficiente. Una vez realizados estos procedimientos, se colocan en heladera (4°C) hasta el día siguiente en que se descartan, a menos que:

-Haya habido algún inconveniente (contaminación, pérdida de las placas, desperfecto de la estufa de cultivo, entre otros). En este caso se vuelven a sembrar los correspondientes medios de cultivo.

- No se observe desarrollo de microorganismos en las placas a las 24 horas de incubación y se haya observado la presencia de más de 5 leucocitos por campo o microorganismos, en el sedimento o en la coloración de Gram. Sembrar en agar chocolate si no se hubiera hecho y/o efectuar una coloración de Gram, si no se hubiera realizado.

- >No se haya sembrado agar chocolate en casos de pacientes que lo hubieran requerido. En este caso se sembrará sólo este medio.

Incubación de las placas

Todas las placas se incuban a 35 +/- 1°C con observaciones diarias.

Las placas de CLDE se incuban en atmósfera normal durante 48 horas y las de agar chocolate en atmósfera enriquecida en CO₂ (sistema de la jarra y la vela o estufa *ad hoc* con CO₂ al 5%), antes de descartarlas como negativas.

Interpretación de los resultados

A) Indicar el recuento de colonias, teniendo en cuenta que 1 colonia = 200 ufc/ml, si se utilizó un ansa de 5 µl, o 1 colonia = 100 ufc/ml, si se utilizó un ansa de 10 µl.

B) Indicar el número de colonias de diferente morfología, si las hubiera, como "tipos diferentes de microorganismos". En esos casos (muestras polimicrobianas), se pedirá nueva muestra sin identificar ni realizar pruebas de sensibilidad cuando el paciente no demuestre poseer condiciones predisponentes (cirugía o instrumentación urológica) o no tenga urocultivos previos polimicrobianos. En estos últimos casos, se jerarquizarán los hallazgos como positivos, aunque siempre conviene confirmar con una segunda muestra.

C) En caso de obtenerse desarrollo bacteriano, se utilizarán los criterios de interpretación listados en la Tabla 2. Estos parámetros sólo deberán ser utilizados a modo de guía, y de ningún modo como único criterio disociado de las condiciones del paciente y de la muestra.

Una vez interpretado el resultado, éste se anota como negativo a las 48 h de incubación, si el recuento no es significativo o si hay ausencia de colonias en esa muestra. Si el resultado es positivo, se observan las características morfológicas de las colonias y se efectúa una coloración de Gram de las mismas, para definir los pasos a seguir. Luego se efectúan las correspondientes pruebas de identificación y el antibiograma.

Tabla 2. Jerarquización de los recuentos microbianos, según el paciente y el método de obtención de la muestra

Paciente	Recuento	Método
Mujeres asintomáticas	$\geq 10^5$ ufc/ml	Chorro medio
Mujeres con disuria/frecuencia	$\geq 10^3$ ufc/ml	Chorro medio
Varones	$\geq 10^3$ ufc/ml	Chorro medio
Pacientes con sonda permanente	$\geq 10^3$ ufc/ml	Goteo de sonda nueva o punción de sonda
Niños	$\geq 10^4$ ufc/ml	Al acecho o por cateterización
Niños	$\geq 10^3$ ufc/ml	Punción suprapúbica (gérmenes de piel)
Niños	Cualquier recuento	Punción suprapúbica (uropatógenos)

Bibliografía específica

Argeri N, Lopardo H. Análisis de orina. Fundamentos y práctica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993.

Lopardo H. Urocultivo Procesamiento, criterios de interpretación e informe. Apuntes de Laboratorio Volumen III. Laboratorios Britania, Buenos Aires, 2013.

Burd EM, Kehl KS. A critical appraisal of the role of the Clinical Microbiology Laboratory in the diagnosis of urinary tract infections. J Clin Microbiol 2011; 49 (9 supplement): S34-8.

Hellerstein S. Recurrent urinary tract infections in children. Pediatr Infect Dis J 1982; 1: 271-81.

McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Cumitech 2C, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., Sharp SE. ASM Press, Washington, DC. 2009.

CAPÍTULO 5

Hemocultivo

Definiciones

Bacteriemia: presencia de bacterias en sangre.

La podemos clasificar en: Transitoria, intermitente y continua.

Es *transitoria* cuando los microorganismos que llegan al torrente sanguíneo son rápidamente eliminados por los mecanismos habituales del sistema reticuloendotelial. Por ejemplo, pequeños traumas, heridas, intervenciones odontológicas y hasta el solo acto de masticar, permiten el ingreso de bacterias a la sangre. Si el individuo tiene sus defensas intactas, estas bacterias son eliminadas sin ocasionar ningún tipo de trastorno.

Es *intermitente*, por ejemplo, en casos de abscesos, desde donde se liberan bacterias a la sangre pero no en forma continuada, sino según las circunstancias. Otro caso de bacteriemia intermitente se da en la brucelosis. En este caso, los microorganismos acantonados en la médula ósea aparecen en la sangre en forma discontinua y por ello se la llama "fiebre ondulante".

Es *continua* cuando el foco está constantemente en contacto con la sangre: Focos endovasculares (catéteres, vegetaciones en las válvulas cardíacas). Este último es el caso más típico (endocarditis infecciosa), pues las vegetaciones donde están instaladas las bacterias están normalmente en las válvulas cardíacas, es decir, en contacto directo con la sangre.

Sepsis: Manifestaciones clínicas, derivadas de la presencia de microorganismos o de sus toxinas, en el organismo humano, y la respuesta sistémica a los mismos.

Su manifestación se produce por la activación de células mononucleares, liberación de monoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquinas (IL), los que a su vez activan a neutrófilos y linfocitos, con la consiguiente respuesta inflamatoria y activación de la coagulación (mecanismo intrínseco).

Septicemia: Cuando la sepsis es consecuencia de una bacteriemia.

Etiología de la sepsis: Bacterias comunes, rickettsias, virus, parásitos, hongos. Todos estos microorganismos pueden producir cuadros, por lo general indiferenciables.

Criterio para definir sepsis

La sepsis se caracteriza por el llamado *síndrome de respuesta inflamatoria sistémica* (SRIS). Se deben de tener en cuenta dos o más de los siguientes parámetros:

Fiebre mayor a 38°C o hipotermia (temperatura menor de 36°C).

Taquicardia mayor a 90 pulsaciones por minuto.

Taquipnea mayor a 20 por minuto o pCO₂ menor de 32 mm de Hg.

Leucocitosis mayor a 12.000 leucocitos/mm³.

Leucopenia menor a 4.000 leucocitos/mm³.

El hemocultivo

Objetivo: Detección de microorganismos vivos en sangre. Tiene valor diagnóstico y pronóstico.

1) Consideraciones clínicas

Los hemocultivos se realizan cuando existe sospecha de bacteriemia. Por ejemplo:

- a) Sospecha de invasión del sistema sanguíneo a partir de un foco de infección.
- b) Cuadro séptico en el recién nacido, en huéspedes inmunológicamente comprometidos, tanto en niños como en adultos.
- c) Infecciones graves, con probabilidad de bacteriemia: Meningitis, neumonía, osteomielitis, artritis, entre otros.
- d) Infecciones intravasculares (infecciones asociadas a dispositivos vasculares, endocarditis)
- e) Síndrome febril prolongado de causa desconocida.

2) Toma y conservación de las muestras

2.1. *Información previa.* Se deberá conocer el diagnóstico presuntivo del paciente, antibioticoterapia recibida previamente a la toma de muestra, edad, sexo y patología de base.

2.2. *Toma de muestra.* Una vez determinado el sitio de punción, se deberá desinfectar la zona elegida con solución antiséptica de clorhexidina.

Del mismo modo, se deberá desinfectar el tapón de goma del frasco de cultivo.

El desinfectante deberá actuar por lo menos un minuto y no se volverá a palpar la zona a punzar después de haber desinfectado la piel. Se limpia con alcohol al 70%. Cada muestra puede obtenerse por punción arterial o venosa, empleando una aguja y jeringa estériles. Las tomas de muestra se efectúan a intervalos, en lo posible mayores de una hora y punzando en distintos sitios.

Nota: El operador deberá usar guantes estériles.

Los detalles de la toma y procesamiento de las muestras se resumen en el Cuadro 1.

2.3. *Volumen de sangre.* El volumen a extraer depende del tipo de paciente: adultos 20-30 ml, niños de 1 a 10 ml y neonatos de 0,5 a 1 ml.

La relación óptima sangre/medio de cultivo es de 1/10 o 1/20. El máximo volumen de sangre a extraer tendrá que ver, además de con las posibilidades que ofrece el paciente, con la capacidad de los frascos que se utilicen.

Se debe tener en cuenta que **la mayor recuperación de microorganismos a partir de hemocultivos, se logra cuando se obtiene un mayor volumen de sangre.**

2.4. *Inoculación de los frascos de cultivo.* La sangre se inyecta a través del tapón de goma desinfectado, cuidando especialmente de no introducir aire en los frascos anaeróbicos. Se mezcla inmediatamente por inversión, para permitir la acción del anticoagulante.

2.5. *Conservación.* Deberán conservarse a temperatura ambiente. Nunca en heladeras.

No se debe introducir nunca aire en la botella anaeróbica. La botella anaeróbica tiene iguales propiedades que la pediátrica, excepto que permite recuperar mejor a los microorganismos microaerófilos y anaerobios.

2.6. *Número de muestras.* No debe ser menor de dos, para tener mayores posibilidades de recuperación del microorganismo causal y, fundamentalmente, para poder descartar contaminaciones y certificar una bacteriemia continua. En adultos, lo más aconsejable es tomar al menos tres muestras.

3) Procesamiento del hemocultivo convencional (Fig.1)

3.1. *Incubación.* Se efectúa a 35°C en atmósfera normal y se observará cada 18-24 h., durante 7 días. Se verificará la aparición o no de turbiedad, cambios de color, hemólisis, burbujas de gas (no agitar el frasco al retirarlo de la estufa).

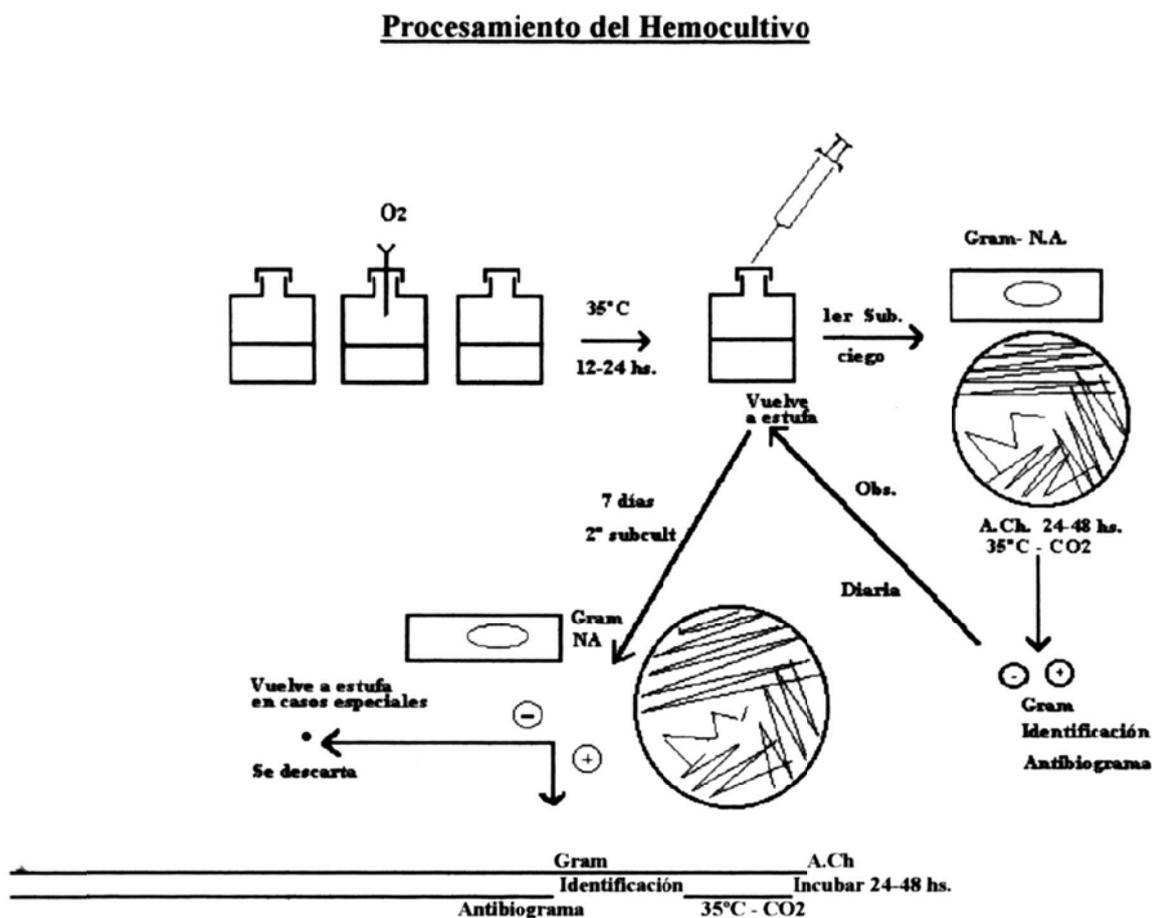
Cuadro 1. Detalles a tener en cuenta al tomar hemocultivos

Errores más frecuentes
Un error que se comete usualmente, es no dejar actuar el desinfectante durante el tiempo suficiente y tomar inmediatamente la muestra. De este modo, ésta puede contaminarse. No se debe extraer sangre para hemocultivo, tomando la muestra de la vía (excepto en casos en que se quiera efectuar cultivo del catéter), ni de una vena del mismo brazo donde ésta se encuentre colocada.
Número de muestras
Como mínimo, dos tomas de venas distintas y en tiempos diferentes.
Volúmenes
La mayor recuperación de microorganismos depende del volumen de sangre obtenido con las limitaciones que impone la capacidad de los frascos empleados y el riesgo de producir anemia en el paciente.

Momento
En lo posible, antes de administrar antibióticos. Si el paciente estuviera recibiendo tratamiento antibiótico, la muestra se deberá tomar en el valle de la concentración de la droga. Es decir, antes de aplicar la próxima dosis. El intervalo entre muestras conviene que sea amplio, pero lo habitual es un intervalo de 1 hora. De ser necesario, se pueden sacar hemocultivos simultáneos, uno de cada brazo. En casos de sospecha de endocarditis infecciosa, conviene tomar 3 ó 4 muestras un día; esperar al día siguiente, y si las primeras muestras continúan negativas y las condiciones del paciente lo permiten, extraer otras 3 ó 4 muestras más.
Conservación y transporte
Deberán conservarse a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio. Enviar lo más rápidamente posible

3.2. *Coloración y subcultivos.* El primer subcultivo y coloración de Gram se realizará entre las 12 y las 24 h, háyase observado o no alguna alteración en los frascos (control ciego). En pediatría, puede realizarse ya a las 6 h. El subcultivo se realizará en agar chocolate y, si en la coloración de Gram se observaron cocos gram positivos, se agregará una placa de agar sangre. En cambio, si se observaron bacilos gram negativos, se agregará agar CLDE, MacConkey o Levine.

Fig 1. Procesamiento del hemocultivo según el método convencional



- a) Desinfectar el tapón de goma. Homogeneizar el medio.
- b) Invertir el frasco y extraer parte del caldo de cultivo con jeringa y aguja estéril (sujetar el émbolo fuertemente, por si existiera presión de gas).
- c) Depositar gotas de la muestra sobre la superficie del agar chocolate y estriar con ansa.
- d) Depositar una gota en un portaobjetos para efectuar coloración de Gram y/o tinción fluorescente con naranja de acridina.

Los subcultivos se deben incubar en atmósfera con tensión de CO₂ aumentada (5-10%), por lo menos 72 h. Observar las placas cada 24 h (el operador debe usar guantes, antiparras, barbijo y guardapolvos y debe trabajar en una cámara de seguridad de tipo II).

e) El segundo subcultivo ciego se realiza a los 7 días, o cuando se observe alguna alteración. La observación de los frascos será diaria, hasta dar por negativo el hemocultivo. Existen casos especiales, para los cuales debe prolongarse la incubación (endocarditis infecciosa, brucelosis, entre otros).

3.3. *Interpretación de los resultados.* Un hemocultivo se considera positivo cuando desarrolla algún germen, pero a ese hallazgo se lo categoriza como clínicamente significativo cuando:

- a) El mismo microorganismo se reitera en dos o más muestras.
- b) Cuando se lo encuentra en una sola muestra, pero simultáneamente se lo recupera de otro material.
- c) Cuando se lo recupera de una o más muestras, y el título de anticuerpos ante la cepa aislada es significativo o asciende durante la evolución del proceso (casos especiales).
- d) Cuando se recupera de una sola muestra, pero se trata de un patógeno rara vez aislado de piel o mucosa o coincide con el cuadro clínico característico. (estos son criterios microbiológicos que deberán ser cotejados con los datos clínicos aportados por el médico tratante).

3.4. *Identificación y realización del antibiograma.* Se puede intentar la realización de un antibiograma directamente del caldo de hemocultivo, para ganar tiempo en la información de la sensibilidad antibiótica. No obstante, este antibiograma, al ser realizado partiendo de un inóculo no controlado, debe tomarse como presuntivo. Sólo se podrán informar en forma confiable aquellos resultados considerados dentro de la categoría de "sensible".

Según la observación de la coloración de Gram de las colonias que crecen en agar chocolate, se pueden iniciar las marchas de identificación correspondientes, primero desde el caldo de hemocultivo y, en forma confirmatoria, desde las colonias desarrolladas en agar chocolate. Las pruebas de sensibilidad a diferentes antibióticos por el método de difusión se efectúan también a partir de las colonias y con inóculo controlado, ahora sí en forma confiable. En casos especiales, se realizan pruebas de sensibilidad por Etest o dilución en medio líquido (ver Parte V, capítulos 2 y 5).

4) Procesamiento del hemocultivo utilizando un aparato automatizado

Se deberán inocular los frascos comerciales apropiados para cada tipo de aparato. Actualmente, en la Argentina se dispone de los sistemas BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU.) y BacTAlert (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Una vez tomada la muestra, los frascos se ubican en los sitios apropiados de un incubador de lectura continua. El aparato detecta el desarrollo microbiano por una reacción de cambio de pH en el medio, y emite una señal visual y otra sonora para alertar al operador. Éste procede a subcultivar y efectuar coloraciones como con el método convencional, pero en este caso, sólo con los frascos positivos (10 a 20% del total). Los frascos negativos se mantienen hasta 5 días y luego se descartan, sin efectuar el subcultivo ciego final. Sólo en casos especiales (sospecha de brucelosis o endocarditis bacteriana) se mantienen en estufa hasta 4 a 6 semanas con repiques semanales ciegos.

5) Consideraciones generales

5.1. *Medio de cultivo.* Es difícil lograr un medio ideal en el que puedan desarrollar, tanto microorganismos aerobios facultativos exigentes o no, como gérmenes anaerobios y hongos. Habitualmente se utiliza el caldo tripteína de soja suplementado, excelente medio para el aislamiento de microorganismos exigentes. También puede utilizarse caldo tioglicolato o infusión cerebro corazón (BHI).

5.2. *Sobre el anticoagulante.* La droga de elección es el polianetolsulfonato de sodio (PSS), que se utiliza en una concentración del 0,025 al 0,05%. Puede tener efecto inhibitorio sobre algunas bacterias (por ejemplo, *Neisseria* spp.). Tiene actividad anticomplementaria que inhibe parcialmente la capacidad fagocitaria de los leucocitos y a ciertos antibióticos aminoglucósidos y polipeptídicos.

5.3. *Sobre la tonicidad del medio.* Se puede utilizar sacarosa al 10-20% que provee un medio hipertónico, previniendo la posible destrucción de bacterias debilitadas, como esferoplastos y protoplastos, que aparecen frecuentemente en la sangre luego de tratamientos con antibióticos que afectan la pared celular. Además, la sacarosa presenta una acción inhibitoria sobre la penicilina y se ha descrito la acción inhibitoria del sulfato de magnesio sobre varios antibióticos.

También pueden agregarse otros compuestos para permitir o favorecer el desarrollo de ciertos microorganismos: menadiona, hemina, cisteína. Los dos primeros son requeridos para el desarrollo de ciertas especies de anaerobios en particular *Prevotella melaninogénica*. La cisteína ayuda a mantener un reducido Eh y permite el desarrollo de microorganismos que exigen tiol, como las bacterias de los géneros *Granulicatella* y *Abiotrophia*.

5.4. *Composición del medio*

Cada frasco de hemocultivo contiene:

1. Medio basal: Caldo tripteína de soja, constituido por un hidrolizado pancreático de caseína y peptona de soja, enriquecido con el agregado de extracto de levadura.
2. Polianetolsulfonato de sodio (PSS) al 0,03%.
3. Sacarosa al 10% y sulfato de magnesio al 0,25%.
4. Menadiona 0,5 µg/ml y hemina 5 µg/ml
5. Cisteína 0,05%.

5.5. *Atmósfera*: La atmósfera inerte en contacto con el medio con CO₂ y N₂, asegura el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas, dependientes de CO₂ y anaerobias facultativas. Hay frascos especiales para aerobios y otros para anaerobios.

6) Hemocultivos por la técnica de lisis centrifugación

Es un complemento útil del hemocultivo tradicional, sobre todo cuando se desean buscar micobacterias, hongos u otros microorganismos exigentes, ya que aumenta la recuperación de éstos. Especialmente, se utiliza en pacientes inmunocomprometidos. De cada toma de hemocultivo tradicional se pueden inocular también 0,5 a 2 ml de sangre en los tubos especiales para este método. Estos tubos poseen saponina como agente lítico, polipropilenglicol como antiespumante, polianetolsulfonato de sodio y EDTA como anticoagulantes, un fluoroquímico inerte. Las muestras deben procesarse inmediatamente después que se reciben en el laboratorio, para maximizar la oportunidad de recuperar microorganismos de pacientes que hubieran estado recibiendo antibióticos. No deben mantenerse en los tubos por más de 16 horas a temperatura ambiente (no refrigerar). Mezclar vigorosamente el contenido del tubo con vórtex. Desinfectar el tapón con clorhexidina y dejar actuar durante un minuto. Usar una jeringa de 3 ml y recolectar cuidadosamente la sangre acumulada en la base del tapón. Eliminar cualquier burbuja de aire, descartar el tubo y dividir el líquido obtenido en placas de medios de cultivo apropiados (agar sangre, agar chocolate, entre otros) o tubos de agar Sabouraud u otros medios para hongos, los que se incubarán en condiciones apropiadas.

Las ventajas de este método se vinculan a que se obtiene el aislamiento de colonias más rápidamente, minimiza los efectos de los antibióticos que estuviera recibiendo el paciente, maximiza la oportunidad del aislamiento de flora polimicrobiana y puede proveer información cuantitativa. La principal desventaja es que si se utilizan métodos caseros, aumenta considerablemente la posibilidad de contaminación.

7) Hemocultivos para micobacterias Ver Parte IV, capítulo 3

CAPÍTULO 6

Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres

Características de los catéteres

La internación de pacientes obliga en muchos casos a indicar tratamientos medicamentosos parenterales. Para poder realizar estos tratamientos se necesita generalmente la colocación de catéteres, transitorios o permanentes, que permitirán el suministro de drogas, sangre o hemoderivados, nutrientes, entre otros (Cuadro 1 y Tabla 1).

Cuadro 1. Clasificación de catéteres

Según el tipo de vaso utilizado	Arterial
	Venoso periférico
	Venoso central
Según el sitio de inserción	Subclavia
	Yugular interna
	Femoral
	Periféricos
	Centrales insertados periféricamente (PICC)
Según la duración	Corta permanencia
	Larga permanencia
Según el trayecto de piel a vena	No tunelizados
	Tunelizados

Según el número de lúmenes	Simple
	Doble
	Triple
Según características especiales	Con/sin manguito de dacrón (<i>cuff</i>)
	Con/sin heparina
	Con/sin impregnación en antibióticos o en antisépticos

La terapéutica intravenosa se indica aproximadamente al 70% de los pacientes internados por diferentes motivos (administración de fluidos, electrolitos, sangre y derivados, drogas, nutrición parenteral, entre otros). Este procedimiento puede conducir a la producción de infecciones que pueden presentarse desde una simple flebitis hasta una septicemia, comprometiendo así la vida del paciente, prolongando su hospitalización o exponiéndolo a nuevas infecciones intrahospitalarias.

La mayoría de las bacteriemias que ocurren en pacientes internados tienen como punto de partida a los catéteres, principalmente los catéteres venosos centrales, que comúnmente se colocan por largo tiempo en pacientes internados en unidades de cuidados intensivos.

Tabla 1. Características de los distintos tipos de catéteres

Tipo de catéter	Sitio de inserción	Largo	Riesgo de infección
Venosos periféricos	Venas de mano o cuero cabelludo	Menos de 10 cm	Flebitis con uso prolongado
Arteriales periféricos	Arteria radial, axilar, braquial, femoral, tibial posterior	Menos de 10 cm	Bajo
De línea media	No en venas centrales	10 – 20 cm	Menos flebitis
CVC no tunelizado	Femoral, yugular interna, subclavia	> 8cm	Bacteriemias
Arterial pulmonar	Arterias centrales	>30cm	Similar a la de los catéteres venosos centrales

CVC de inserción periférica (PICC)	Insertados en cefálica, basílica o braquial (llegan hasta la cava superior)	>20 cm	Menor porcentaje de infecciones que CVC no tunelizados
CVC tunelizados	Yugular interna, femoral o subclavia	>8 cm	Menor porcentaje de infecciones que CVC no tunelizados
Totalmente implantado	Con reservorio subcutáneo Subclavia o yugular interna	>8 cm	Son los de menor riesgo
Catéter umbilical	Arteria o vena umbilical	<6 cm	Riesgo moderado

CVC = catéter venoso central

Vías de infección

Las infecciones se producen debido a la adherencia de microorganismos al dispositivo, se debe a una compleja interacción entre los microorganismos, el huésped y la superficie del catéter.

Diferentes estudios han demostrado que algunos microorganismos tienen mayor capacidad para adherirse a cuerpos extraños, debido a la producción de una glucoproteína, que forma una especie de "barro" (*slime*) alrededor de las colonias. Esta sustancia interacciona con las proteínas del paciente y forma una biopelícula o *biofilm* que produce la unión de las bacterias al catéter y las protege de las defensas del hospedador.

Las bacterias cubiertas por el *biofilm*, pueden incluso disminuir su sensibilidad a algunos antibióticos.

Los materiales con que están contruidos los catéteres, que presentan diferente porosidad, influyen en la adherencia de los microorganismos y en la formación de *biofilms*.

Piel pericatóter

La piel habitualmente está colonizada por ciertos microorganismos considerados como miembros de la microbiota habitual de esa zona. Estos microorganismos pueden migrar a través de la interfase piel-catéter y así pueden llegar a infectar la porción intravascular del mismo. Esta vía es la más frecuente en catéteres de corta permanencia.

Conexión del catéter con el sistema de tubuladuras de perfusión

Puede contaminarse a través de una manipulación descuidada y, secundariamente, se produce la contaminación de la porción intravascular del catéter. Esta vía es la más frecuente en catéteres de larga permanencia, tanto implantables como semiimplantables.

Fluidos para la administración intravenosa

Pueden contaminarse por una manipulación inadecuada en la utilización (contaminación extrínseca) o en la fabricación (contaminación intrínseca). Según la magnitud del inóculo puede producirse bacteriemia inmediata o colonización de la porción intravascular del catéter. Se han relacionado con esta vía productos sanguíneos, sueros glucosados, soluciones de alimentación parenteral (Cuadro 2).

Vía hematológica

Es la vía menos frecuente de infección del catéter. El origen es un foco distante de infección (urinario, pulmonar, osteoarticular, entre otros).

La bacteriemia asociada a catéteres tiene una incidencia que varía según el centro médico y se relaciona directamente con la frecuencia de recambio del dispositivo y los factores predisponentes del huésped. Los catéteres venosos periféricos son los más usados como accesos venosos; y si bien se asocian a bajos índices de bacteriemia, la morbilidad asociada a los mismos es importante dada la frecuencia de su uso.

El aumento de la complejidad en la atención de los pacientes en cuidados intensivos ha llevado al desarrollo de una variedad de elementos: Swan–Ganz, marcapasos transitorios, catéteres venosos centrales, catéteres de corta permanencia, entre otros. Por otro lado, se han buscado mejorar la calidad de los materiales haciéndolos más flexibles y con menor adherencia, con el propósito de que permanezcan más tiempo y con menores posibilidades de complicaciones trombóticas.

Cuadro 2. Contaminación de distintas soluciones. Agentes etiológicos.

Microorganismos	Preparación
<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,	

<i>Burkholderia cepacia</i> Flavobacterias	Suero glucosado
<i>Candida</i> spp.	Aminoácidos
<i>Malassezia furfur</i>	Soluciones lipídicas
<i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia</i> spp, <i>Yersinia enterocolítica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Salmonella</i> spp. Flavobacterias	Productos sanguíneos
<i>Burkholderia cepacia</i> Flavobacterias, <i>Pseudomonas</i> spp.	Desinfectantes/antisépticos

La evolución en la terapéutica intravenosa y el descubrimiento de diferentes mecanismos de adherencia de los microorganismos, que de alguna manera sobrepasan los mecanismos de defensa del huésped e impiden la difusión de los antibióticos al sitio de infección, nos lleva a considerar a la prevención como uno de los pasos más importantes para la disminución de la incidencia de infecciones relacionadas a catéteres.

Se considera que un paciente puede tener un catéter infectado cuando presenta algunos de estos signos sin ningún otro foco de infección: (1) fiebre, (2) dolor o eritema o calor o purulencia en el sitio de inserción del catéter (o en el bolsillo subcutáneo si es implantable), (3) escalofríos, (4) hipotensión, (5) en menores de 12 meses (uno de los siguientes): fiebre, hipotermia, apnea, bradicardia.

Definiciones de Infección relacionada al catéter

Según el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU.) se considera que un paciente puede tener un catéter infectado cuando presenta uno de los siguientes signos sin ningún otro foco de infección:

1. Fiebre
2. Dolor o eritema o calor o presencia de material purulento en el sitio de inserción del catéter o en el bolsillo subcutáneo si éste es implantable
3. Escalofríos
4. Hipotensión.

En niños menores de 12 meses (uno de los siguientes):

1. Fiebre
2. Hipotermia

3. Apnea
4. Bradicardia.

Bacteriemia relacionada a catéter confirmada

Igual microorganismo aislado del catéter que de hemocultivos periféricos y que no se haya aislado de ningún otro foco.

Probable infección relacionada al catéter

a) Aislamiento en hemocultivos periféricos de estafilococos coagulasa negativos, *S. aureus* o *Candida* sp. en un paciente con signos de infección sin otro foco probable que el catéter.

b) Paciente con signos de infección cuyo único foco probable es el catéter y que clínicamente evoluciona en forma favorable luego de retirarlo, con o sin aislamiento de gérmenes en los cultivos.

Colonización del catéter

Aislamiento de microorganismos en el catéter pero no en los hemocultivos, sin signos ni síntomas de infección.

Bacteriemia relacionada a la infusión

Aislamiento del mismo microorganismo a partir de la infusión y de la sangre sin otra fuente identificable de infección.

Tromboflebitis séptica

Infección de la vena cateterizada asociada a trombosis y secreción purulenta.

Infección del sitio de inserción

Eritema, dolor, induración o exudado purulento en las proximidades del sitio de inserción del catéter.

Infección del túnel

Eritema, dolor e induración en los tejidos que están por encima del catéter a más de 2 cm del sitio de inserción.

Bacteriemia relacionada a la infusión

Aislamiento de la infusión y de la sangre del mismo microorganismo sin otra fuente identificable de infección.

Tromboflebitis séptica

Infección de la vena cateterizada comúnmente asociada a trombosis y secreción purulenta.

Infección del sitio de inserción

Eritema, dolor, induración o exudado purulento en un área de 2 cm periférica al sitio de inserción del catéter.

Infección del bolsillo

Eritema y necrosis de la piel arriba del reservorio de un dispositivo totalmente implantable o exudado purulento en el bolsillo subcutáneo.

Infección del túnel

Eritema, dolor e induración en los tejidos sobre el catéter a más de 2 cm del sitio de inserción.

Cultivo del catéter

El cultivo del catéter sólo está indicado frente a sospecha clínica de infección relacionada al mismo. Dado el bajo valor predictivo positivo, el cultivo en pacientes sin síntomas puede llevar a tratamientos antibióticos innecesarios y a un aumento considerable de costos.

La colonización microbiana de la superficie de los catéteres puede ocurrir ya a las 24 h después de colocados. Los microorganismos sobre estas superficies toman dos formas: a) las bacterias que se encuentran en el *biofilm* adherido al dispositivo y b) las que se encuentran en estado planctónico en el medio líquido. Los métodos de cultivo a utilizar dependerán de si el catéter es removible (de corta permanencia) o no (larga permanencia).

El diagnóstico microbiológico de los catéteres de corta permanencia se realiza a través de cultivo de la punta del catéter por técnicas semicuantitativas y/o cuantitativas. Respecto a estas últimas, existen diferentes variaciones en la metodología que emplean el lavado interno del catéter, agitación por medio de vórtex, sonicación y centrifugación.

Dentro del último grupo, la metodología de Brun Buisson y col (agitación por medio de vórtex y realización de diluciones posteriores), presenta las ventajas de ser práctica, evaluar simultáneamente la parte externa e interna del catéter y de tener menor manipulación de la muestra con respecto al lavado interno con aguja y jeringa.

Sólo en los catéteres tunelizados (cuando se sospeche “tunelitis”), para aumentar el rendimiento, es aconsejable el cultivo de distintas porciones del segmento subcutáneo. Se deben extraer además, antes de la remoción del catéter y de ser posible al inicio de la terapéutica, dos hemocultivos de venas o arterias distintas de la cateterizada. No se deben tomar los hemocultivos a través del catéter, puesto que un resultado positivo de los mismos puede reflejar sólo colonización endoluminal o de la conexión.

Para diagnosticar bacteriemia asociada a catéteres de larga permanencia, al no ser removibles, se trata de determinar si existe una mayor densidad microbiana en el lumen del catéter que en la sangre periférica. Para ello se pueden utilizar técnicas cuantitativas de la sangre tomada a través del catéter como única muestra. También se puede realizar una comparación de muestras tomadas de sangre periférica respecto a sangre tomada a través del catéter. Una manera de efectuar esa comparación es determinando el tiempo de positivización diferencial de hemocultivos tomados a través del catéter y de sangre periférica (con sistemas automatizados). Otra, es cultivando cuantitativamente alícuotas de sangre tomadas de ambas fuentes (ver más adelante).

Catéteres de corta permanencia

Técnicas semicuantitativas

Técnica de Maki (Cultivo por rotación del catéter con hemocultivo asociado)

Se debe sacar un hemocultivo convencional de una vena periférica. Luego se retira el catéter, se cortan a aproximadamente 5 cm de la punta y se coloca ésta en un recipiente estéril con tapa a rosca.

Esta muestra debe ser enviada junto al frasco de hemocultivo. No se debe recibir la punta de catéter sin el hemocultivo asociado.

La punta del catéter se rota cuatro o cinco veces sobre una placa de agar sangre. Esta placa se debe incubar a 37°C durante 48-72 h y luego realizar el recuento e identificar las colonias (Fig.1).

Se toma como punto de corte el valor de 15 colonias.

Este método presenta las siguientes desventajas:

- Sólo evalúa los microorganismos adheridos a la parte externa. De este modo, se pueden perder las infecciones que se originan en la conexión y siguen la vía endoluminal.
- En los catéteres curvos puede ser difícil que toda la superficie toque el agar.

Técnicas cuantitativas

Técnica de Cleri

Consiste en lavar tres veces con aguja y jeringa el interior de un catéter sumergido en un volumen medido de caldo (2-10 ml, de acuerdo al tamaño del mismo), luego se realizan diluciones y se siembra un volumen determinado en placas de agar sangre.

Se considera como punto de corte a valores $\geq 10^3$ ufc/ml.



Figura 1. Método de Maki. Rotación de la punta de un catéter sobre la superficie de una placa de agar sangre.

Técnica de Liñares

Esta es una modificación a la técnica de Cleri, que consiste en lavar la parte interna del catéter, pero sin sumergirlo en el caldo o la solución fisiológica, y luego realizar el método de Maki. De esta forma, se evalúa la vía endoluminal por un lado, y la vía interfase piel-catéter por otro.

Técnica de Brun Buisson

Consiste en agitar la punta del catéter, con vórtex en 1 ml de caldo o solución fisiológica durante un minuto, hacer diluciones, y sembrar un volumen definido.

Estos autores también tomaron como punto de corte al valor de $\geq 10^3$ ufc/ml. Al igual que el método de Cleri, permite evaluar las bacterias adheridas a la parte interna y externa del catéter.



Fig 2. Agitación de un catéter con vórtex. Método de Brun Buisson

Técnica de agitación por sonicación

Esta metodología no difiere sustancialmente de la agitación con vórtex, sólo que en este caso se aplica el ultrasonido. En general, para este método se consideró el punto de corte de $\geq 10^2$ ufc/ml.

Catéteres de larga permanencia

Más del 90% de las sepsis relacionadas a catéteres, se asocian con catéteres venosos centrales. La inflamación en el sitio de inserción no siempre se debe a infección y, por otra parte, los signos locales pueden estar ausentes en el 70% de los casos relacionados a este tipo de dispositivos.

La infección frecuentemente se manifiesta por la aparición de fiebre, pero en pacientes internados en terapia intensiva, entre un 80 y un 90% de los episodios febriles no se deben a infecciones de catéteres. Debido a esto, se estima que el 75-85% de los catéteres se remueven innecesariamente. Por este motivo, hay que tratar de establecer el diagnóstico de infección sin retirarlos. Para ello se utilizan el recuento cuantitativo de la sangre a través del catéter, sola o comparada con sangre periférica o el tiempo de positivización diferencial en sistemas automatizados de hemocultivos, entre hemocultivos periféricos y aquellos tomados a través del catéter.

La primera es la metodología más difundida. Consiste en tomar sangre de vena periférica y a través del catéter (retrocultivo). Ambas muestras se cultivan en forma cuantitativa. Habitualmente se considera infección relacionada al catéter cuando el recuento de colonias del retrocultivo es 5 veces mayor que el de la sangre periférica, en el contexto de un cuadro clínico compatible y en ausencia de otro foco infeccioso.

Las técnicas utilizadas para cuantificar la bacteriemia son las siguientes:

Hemocultivo con recuento diferencial

Se debe sacar sangre a través del catéter y se introducen 2 ml en un tubo estéril con heparina y tapa a rosca. Simultáneamente, se debe sacar sangre de una vena periférica y colocar 2 ml de sangre en otro tubo con heparina. Al mismo tiempo se deben tomar muestras de hemocultivo, una a través del catéter y otra a través de una vena periférica.

Se dispone de dos frascos con 9 ml de agar BHI fundido y enfriado a 45-50°C. A uno de ellos se le agrega 1ml de la sangre tomada a través del catéter y al otro, 1ml de sangre periférica. Ambos frascos se agitan y se vuelcan en sendas placas de Petri estériles. Una vez solidificado el agar, se llevan a estufa y se incuban a 35°C durante 72 h. en atmósfera de 5% de CO₂. Al cabo de ese tiempo se efectúa la lectura del recuento microbiano, la que se expresa en ufc/ml. Una diferencia de 5 veces a favor de la muestra tomada a través del catéter sugiere infección asociada al mismo.

Lisis centrifugación

Este método permite procesar volúmenes de sangre mayores que el anterior, pero es más costoso. En el caso de adultos se colocan 10 ml de sangre periférica y 10 ml de retrocultivo en tubos *Isolator* comerciales o en tubos con saponina de fabricación casera. En pediatría se utilizan volúmenes de 1 ml.

La sangre se pone en contacto con el medio, se centrifuga a 2.500-3.000 rpm durante 30 minutos, se descarta el sobrenadante y se siembra la totalidad del sedimento en placas de agar sangre, agar chocolate (ambas incubadas en CO₂, durante 72 h) y CLDE o similar (en aerobiosis).

El tubo pediátrico no se centrifuga y se utiliza la totalidad del volumen.

Para realizar el cálculo del número de colonias por mililitro, se aplica la fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ colonias total} \times \text{N}^\circ \text{ placas sembradas}}{\text{N}^\circ \text{ placas crecidas} \times \text{volumen de sangre}} = \text{ufc/ml}$$

Siembra en superficie

Se coloca 0,1 ml de sangre por placa y se disemina con espátula de Drigalski. Es un método práctico, pero su principal desventaja es el pequeño volumen procesado que puede afectar la recuperación de bacteriemias de bajo grado.

Utilización del tiempo de positivización diferencial en sistemas automatizados de hemocultivos.

Se utiliza un equipo que procesa muestras de hemocultivo en forma automática (BACTEC, BacT/ALERT, entre otros). La diferencia en el tiempo de positivización, entre la sangre obtenida a través de un catéter y la periférica, refleja diferencias en la concentración de microorganismos. Para una diferencia de tiempo de 120 minutos (positivización más temprana para la sangre a través del catéter), la especificidad es de aproximadamente 100% y la sensibilidad, de 94,6%. En el caso de pacientes con focos distintos al catéter, la diferencia en el tiempo de positivización es menor a 75 minutos.

Comparando la metodología de tiempo diferencial con la del recuento diferencial, se obtuvo una buena correlación entre ambas.

Hay que tener presente que: para que resulte útil, debe aplicarse principalmente a catéteres de larga permanencia; los frascos utilizados para las muestras pareadas deben ser del mismo tipo; las muestras a través de catéter y de vena periférica deben ser tomadas y luego introducidas al aparato en el mismo momento; y el volumen de ambas muestras debe ser igual.

Etiología de la sepsis relacionada a catéteres

Los estafilococos coagulasa negativos (SCN), especialmente *S. epidermidis*, causan la mayoría de las infecciones asociadas a catéteres. En frecuencia, le siguen los bacilos gram negativos en conjunto, *S. aureus*, enterococos y *Candida* spp. Ocasionalmente, se han documentado casos con bacilos gram positivos diferomorfos, bacilos gram negativos no fermentadores infrecuentes, hongos filamentosos, *Bacillus* spp., estreptococos del grupo viridans, entre otros.

Bibliografia

- Andremont A, Paulet R, Nitenberg G, Hill C.** Value of semiquantitative cultures of blood drawn through catheter hubs for estimating the risk of catheter tip colonization in cancer patients. *J Clin Microbiol.* 1988 26:2297-2299.
- Atela I, Coll P, Rello E et al.** Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheters: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1784-1790.
- Blot F, Schmidt E, Nitenberg G, et al.** Earlier positivity of central-venous versus peripheral blood cultures is highly predictive of catheter related sepsis. *J Clin Microbiol.* 1998;1:105-109.
- Brun Buisson C, Abrouk F, Legrand P, et al.** Diagnosis of central venous catheter related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med.* 1987; 147:873-877.
- Capdevila J.** Current methods for the diagnosis of catheter-related bacteremia. *Rev Med Microbiol.* 1997; 8:189-195.
- Cleri D, Corrado M, Seligman S.** Quantitative culture of intravenous catheters and others intravascular inserts. *J Infect Dis* 1980;6:781-786.
- Collignon P, Soni J, Pearson I, et al.** Is semiquantitative culture of central vein catheter tips useful in the diagnosis of catheter-associated bacteremia? *J Clin Microbiol.* 1986; 24:532-535.
- Douard M, Arlet G, Leverger G, et al.** Quantitative blood cultures for diagnosis and management of catheter-related sepsis in pediatric hematology and oncology patients. *Intensive Care Med* 1991;17:30-35.
- Gaur A, Flynn P, Giannini M, et al.** Difference in time to detection: a simple method to differentiate catheter-related from non-catheter-related bloodstream infection in immunocompromised pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:469-475.
- Goldmann D, Pier G.** Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6:176-192.
- Haslett T, Isenberg H, Hilton E, et al.** Microbiology of indwelling central intravascular catheters. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:696-701.
- Kite P, Dobbins B, Wilcox M, et al.** Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal. *Lancet.* 1999; 131:641-647.
- Liñares J, Sitges Serra J, Garau J, et al.** Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative culture of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol.* 1985;3:352-360.
- Maki D, Weise E, Sarafin H.** A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter related infection. *New Engl J Med.* 1977; 23:1305-1309.

- Maki,D.** Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. En: Bisno A, Waldvo F (ed.). Infection associated with indwelling medical devices. ASM Press, Washington DC. 1994, p.155-213.
- Mosca R, Curtas S, Forbes B, et al.** The benefits of isolator cultures in the mangement of suspected catheter sepsis. Surgery. 1987; 102:718-723.
- Rello J, Coll P, Prats G.** Evaluation of culture techniques for diagnosis of catheter-related sepsis in critically ill patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11:1192-1193.
- Sherertz R, Raad I, Belani A, et al.** Three years experience with sonicated vascular catheter cultures in clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol . 1990; 1:76-82.
- Soloaga R, Couto E, Veron T, et al.** Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres. Infectol & Microbiol Clín. 1993; 5:28-35.
- Soloaga R, Procopio A, Etchevez C, et al.** Rendimiento de las técnicas cuantitativas y semicuantitativas en bacteriemias asociadas a catéteres. Infectol & Microbiol Clin. 1994;6:169-174.
- Soloaga R, Tokumoto M, Fernández A, et al.** El laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de la bacteriemia relacionada con los catéteres. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2000; 18:62-66.
- Soloaga R, Guelfand L, Manganello S, et al.** Cultivos cuantitativos de catéteres por la técnica de Brun Buisson. Rev Argent Microbiol. 2002; 34:100-103.
- Weightman N, Speller D.** Pour plate blood cultures to detect bacteremias related to indwelling central venous catheters. J Hosp Infect. 1986; 8:203-203.

CAPÍTULO 7

Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos

Estructura de la piel y tejidos subyacentes

La piel cumple numerosas funciones que tienen que ver con el control de la temperatura corporal, intercambio de agua y sales con el medio exterior, recepción de estímulos sensoriales, entre otras. Una de las funciones más importantes es la de ser una barrera protectora primaria que impide el libre ingreso de los microorganismos al organismo humano.

No obstante, la piel le sirve de albergue a numerosas especies bacterianas que son consideradas como parte de la microbiota habitual de la superficie de este tejido. Los más conocidos y frecuentes, considerados dentro de esta denominación son *Staphylococcus* spp. coagulasa negativos, bacilos gram positivos difteromorfos y *Propionibacterium acnes*, un coco gram positivo anaerobio que ocupa sitios con baja pO₂, como son los folículos pilosos.

La capa más externa de la piel es la epidermis, luego le siguen la dermis, el tejido celular subcutáneo, la fascia y finalmente encontramos el músculo. Los distintos tipos de infecciones que pueden ocurrir en cada una de estas capas de tejidos pueden verse en la Tabla 1.

La invasión de microorganismos externos hacia las capas más profundas de la piel pueden originarse por aprovechamiento de microescoriaciones, por presencia de alguna enfermedad que destruya tejidos (por ejemplo, cáncer), por traumatismo, por mordeduras o picaduras o por cirugía. También los microorganismos pueden llegar por vía hematógena.

Tabla 1. Estructura de la piel y tejidos subyacentes e infecciones

Capa de tejido	Infección posible
Epidermis	Eritrasma Dermatofitosis Impétigo Foliculitis Ectima Erisipeloide Forúnculo

Dermis	Carbunco Celulitis Erisipela
Tejido celular subcutáneo (TCS)	Erisipela (parte superficial del TCS) Celulitis
Fascia	Fascitis necrotizante
Músculo	Miositis

Una condición especial que presentan los pacientes diabéticos es el denominado pie diabético. Se manifiesta en forma de úlceras crónicas producidas por la neuropatía sensitivo-motora que presentan estos pacientes. Es así que algunos traumas pueden pasarles inadvertidos o pueden sufrir de algún tipo de desbalance muscular que les obligue a apoyar el pie de una manera anormal y que eso les genere lesiones. También presentan una neuropatía autonómica, que les produce disminución de la sudoración. Esto les provoca sequedad en la piel y ésta se puede fisurar. Además pueden presentar oclusión de grandes y pequeños vasos por aterosclerosis y eso impide que la zona esté bien irrigada. Como agravante, los diabéticos, por su hiperglucemia, tienen alteradas las funciones de quimiotaxis y fagocitosis de neutrófilos y macrófagos.

Las manifestaciones más importantes de las infecciones de piel y tejidos blandos pueden verse en la Tabla 2.

Infecciones necrotizantes

Son infecciones generalmente graves que pueden ser progresivas y producen una necrosis tisular que puede involucrar a tejidos muy profundos, como el músculo. Entre ellas podemos contar la gangrena sinérgica, frecuentemente debida a una complicación infecciosa de una cirugía abdominal y caracterizada por una infección mixta con cocos gram positivos aerobios (estreptococos) y microaerófilos y enterobacterias.

La gangrena gaseosa es otra de estas infecciones, comúnmente fatal o desencadenante de amputaciones de miembros. El agente etiológico más frecuente es *Clostridium perfringens*, aunque también pueden estar involucradas otras especies de *Clostridium*. Se origina por traumatismo, cirugía o por neoplasias, que facilitan la entrada de estas bacterias. La producción abundante de gas hace que las lesiones necróticas de piel se acompañen de la crepitación de los tejidos, característica importante de esta entidad clínica.

Otra infección necrotizante que suele darse en diabéticos es la celulitis no clostridial anaeróbica. Generalmente la antecede una infección local de menor gravedad. Suelen aislarse anaerobios como *Bacteroides* spp. y *Peptostreptococcus* spp. y enterobacterias como *E. coli* o *Klebsiella* spp.

Otras infecciones que no involucran al músculo pero conllevan un riesgo importante para la vida del paciente son las fascitis necrotizantes.

Tabla 2. Manifestaciones de las infecciones de piel y tejidos blandos

Nombre	Descripción	Agente etiológico posible
Mácula	Mancha plana y circunscrita	Hongos, virus, <i>Treponema pallidum</i>
Pápula	Lesión sólida y sobreelevada	Virus, sarna, <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Nódulo	Lesión sólida y más sobreelevada	Hongos, <i>Nocardia</i> , <i>C. diphtheriae</i> , <i>S.aureus</i> , micobacterias
Pústula	Colección de leucocitos circunscrita	Hongos, virus, <i>S. aureus</i>
Vesícula	Colección similar a una ampolla pero de menor tamaño	Virus
Escamas		Hongos, <i>S. pyogenes</i> (escarlatina)
Úlcera	Pérdida de la epidermis y de la dermis	<i>Haemophilus ducreyi</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Bacillus anthracis</i>
Ampolla		<i>Clostridium</i> spp., <i>S. aureus</i> (síndrome de la piel escaldada), Virus, <i>Vibrio</i> spp., <i>S. pyogenes</i> , bacilos gram negativos
Foliculitis	Infección de los folículos pilosos	<i>S. aureus</i> , <i>P. acnes</i>
Forúnculo	Absceso que comienza como una foliculitis, pero que se agranda, duele y se llena de pus	<i>S. aureus</i>
Ántrax	Forúnculos que se extienden hacia la dermis	<i>S. aureus</i>
Erisipela	Lesión eritematosa (roja) dolorosa de borde nítido y bien delimitado	Estreptococos beta-hemolíticos
Eritrasma	Infección crónica de la piel, seca, escamosa, pruriginosa de color pardo rojizo	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
Erisipeloide	Lesión cutánea pruriginosa, no vesiculosa de color violáceo y borde elevado	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Impétigo	Lesiones eritematosas que pueden o no transformarse en ampollas	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i>
Celulitis	Infección difusa que afecta hasta las capas más profundas de la dermis y el tejido celular subcutáneo. Las lesiones no son definidas, planas y dolorosas	Estreptococos beta-hemolíticos, <i>S. aureus</i> y menos frecuentemente <i>Aeromonas</i> y <i>Vibrio</i> . Celulitis facial o periorbitaria en niños: <i>H. influenzae</i> o <i>S. pneumoniae</i>

La fascitis necrotizante de tipo 1 es producida por enterobacterias + anaerobios + *S.aureus* + enterococos. Tiene como origen la infección de heridas quirúrgicas, especialmente en la zona perineal y, frecuentemente, en pacientes diabéticos por sus complicaciones vasculares periféricas.

La fascitis necrotizante de tipo 2 se origina por trauma, cirugía, quemadura o lesiones de la varicela y tiene por agente etiológico a *Streptococcus pyogenes*.

Infecciones posteriores a mordeduras

A pesar de la gran urbanización llevada a cabo por la sociedad moderna, todavía las lesiones debidas a mordeduras de animales constituyen un problema médico que conlleva enormes costos y trastornos leves o graves para los pacientes. Se calcula que se producen anualmente varios millones de heridas por mordeduras, más de un millón de ellas requieren atención médica y algunos cientos llegan a la muerte. La mortalidad está confinada a los grupos de riesgo (inmunodeprimidos) y, eventualmente, a mordeduras producidas por grandes animales. En realidad, el 97,3% de las heridas producidas por mordeduras de animales son leves y sólo requieren tratamiento ambulatorio. Sólo el 2,7% restante requiere internación más o menos prolongada.

El porcentaje de infección varía según la especie del agresor y los gérmenes por lo general reflejan la microbiota oral del mismo. Sin embargo, los microorganismos infectantes pueden provenir de la microbiota de la piel del agredido o del medio circundante (por ejemplo, que la herida se contamine con bacterias del ambiente o que el animal tenga algún elemento extraño en la boca, como pasto, semillas, restos de vegetales, entre otros).

Las complicaciones infecciosas, más allá del compromiso de piel y tejidos blandos, pueden ser osteomielitis, artritis séptica, tenosinovitis, celulitis y septicemia. Entre 10 y 20 son los casos fatales que se cuentan anualmente en los Estados Unidos. También hay que considerar a las mordeduras humanas.

Clasificación

Las lesiones por mordeduras pueden clasificarse en:

- (1) Lesiones con desgarramiento. Generalmente se acompañan de una cierta dosis de aplastamiento. Se dan principalmente en mordeduras de grandes animales y de perros.
- (2) Lesiones punzantes. Son el resultado de la inserción de dientes delgados y penetrantes como los del gato o las víboras. Pueden llegar a tejidos más profundos, incluso pueden llegar a comprometer tendones, articulaciones y huesos.
- (3) Rasguños. Generalmente son de menor importancia a menos que se infecten.

Las mordeduras humanas a su vez pueden clasificarse en:

- (1) Autoagresiones. Generalmente son superficiales y consisten principalmente en casos de paroniquia
- (2) Lesiones oclusivas. Son lesiones intencionales violentas infligidas en peleas o, a veces, pueden ser pasionales.
- (3) Mordedura del puño del agresor (*clenched-fist*). Se producen accidentalmente, al golpear los nudillos de la mano con los dientes de la persona agredida.

Infecciones por mordeduras de animales

En las ciudades son más frecuentes los ataques por mascotas. Principalmente perros y gatos, pero también hámsteres, cobayos, o bien por animales exóticos que algunos crían en sus casas: loros, tortugas, iguanas. En las zonas más agrestes, en circos o en zoológicos, prevalecen las mordeduras producidas por animales salvajes. Mientras que en zonas rurales, las producidas por grandes animales de granja (vacas, ovejas, caballos, cerdos) o perros de mayor porte.

En general, el tratamiento profiláctico oportuno previene infecciones en la mayoría de los casos. No obstante, algunas heridas se infectan en porcentajes variables según la especie del agresor.

Infecciones por mordeduras de perros

Las mordeduras de perro dan cuenta de un 80 a un 90% de todas las mordeduras de animales que requieren internación. Aproximadamente un 20% de las heridas producidas por mordeduras de perros se infectan, en comparación con las producidas por otros animales (exceptuando el gato), que no superan el 4%. Esto podría deberse a dos factores: (1) la flora gingival particular del perro; (2) la isquemia que se produce en la zona causada por la fuerza de compresión ejercida por las mandíbulas del animal, la cual aplasta los tejidos blandos.

Además de *Pasteurella multocida*, otras especies de *Pasteurella*, *Bergeyella* (*Weeksellia*) *zooelcum*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius* pueden encontrarse otros microorganismos en las heridas infectadas e incluso en sangre o tejidos profundos.

Infecciones por mordeduras de gatos

Más de medio millón de personas reciben mordeduras de gatos cada año en los EEUU. Son más comunes en mujeres que en varones y ocurren, principalmente, en las extremidades superiores. Corresponden a entre un 3 a un 15% de las mordeduras en pacientes que concurren al hospital.

Aproximadamente la mitad de estas heridas se infectan, por lo que reciben habitualmente tratamiento profiláctico.

Pasteurella multocida ha sido cultivada del tracto respiratorio superior del 50-70% de los gatos domésticos sanos y en cerca del 100% de los enfermos.

La mayoría de las heridas producidas por mordeduras de gatos se infecta con *Pasteurella multocida*. No obstante, lo más común es que se trate de infecciones polimicrobianas de las que pueden aislarse, además de *Pasteurella*, estreptococos, estafilococos y enterobacterias.

Mordeduras en general

Frecuentemente, los cultivos son polimicrobianos, si bien es posible que un único germen progrese como agente etiológico de la infección. Las heridas por mordedura de felinos, se infectan principalmente con *Pasteurella multocida*, las provocadas por perros pueden tener también *Capnocytophaga canimorsus* y las vinculadas a animales salvajes y en especial a ofidios, *Aeromonas hydrophila*. Las mordeduras de animales acuáticos también pueden infectarse con especies de *Aeromonas*, pero también con especies de *Vibrio*. Este conocimiento permitiría ajustar los tratamientos empíricos iniciales según el tipo de animal agresor. La literatura refiere que utilizando una profilaxis adecuada y oportuna, la tasa de infección por mordeduras puede disminuir radicalmente.

Cultivo de muestras provenientes de infecciones de piel y tejidos blandos

La recomendación para el cultivo de las infecciones de piel y tejidos blandos tiene como principal elemento a valorar la posibilidad o no de la presencia de anaerobios.

Para infecciones necrotizantes y mordeduras es indispensable el uso de medios para anaerobios, no así para infecciones superficiales. Como mínimo, entonces, se sugiere efectuar una coloración de Gram y sembrar:

- 1) Una placa de agar sangre (incubación a 35°C en atmósfera normal).
- 2) Una placa de agar chocolate (incubación a 35°C en atmósfera con 5% de CO₂).
- 3) Un tubo con caldo tioglicolato (incubación a 35°C en atmósfera normal).

Para infecciones necrotizantes y mordeduras, agregar:

- 1) Una placa de agar sangre lacada + vitamina K (incubación en anaerobiosis).
- 2) Un caldo anaeróbico (incubación en anaerobiosis).

Para el caso de mordeduras, se procede como para infecciones necrotizantes, excepto en los siguientes casos, en que pueda sospecharse otro tipo de microorganismos:

- 1) Mordedura de rata. Como hay microorganismos especialmente involucrados en infecciones por mordedura de rata, se debe prestar atención al desarrollo tardío de *Streptobacillus moniliformis*, en caldo tioglicolato, en forma de gránulos, y en agar sangre

o agar chocolate. Si el paciente proviene del continente asiático, se recomienda efectuar una observación en campo oscuro, para detectar la presencia de *Spirillum minus*.

- 2) Si se trata de un animal de vida silvestre o de granja, efectuar también una siembra para hongos en medio de Sabouraud e incubar un tubo a 25°C y otro a 35°C.
- 3) Si se trata de un animal acuático, sembrar también en medio de Lowenstein y Jensen, e incubar a temperatura ambiente (*Mycobacterium marinum*).

Bibliografía específica

Murphy E. Microbiology of animal bites. Clin Microbiol Newsl 2008; 30: 47-50.

Bowman MJA. Animal bites in infants and children: an approach to diagnosis and treatment. Pediatr Emerg Med Rep. 1999; 4: 53-62.

Myers JP. Bite wound infections. Curr. Infect Dis Rep 2003; 5: 416-25.

CAPÍTULO 8

Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares

Definición

Las infecciones osteoarticulares engloban distintos tipos de procesos que afectan al hueso de forma primaria, como en el caso de las osteomielitis de origen hematógeno o las artritis sépticas. O bien, tras cirugía, con o sin implantación de material de osteosíntesis o prótesis articulares.

Artritis séptica

La artritis séptica es la infección de la articulación nativa por microorganismos piógenos (fundamentalmente bacterias). Éstas llegan a la articulación por inoculación directa o, con mayor frecuencia, por vía hematógena. Se produce la destrucción rápida del espacio articular y por ello se requiere un diagnóstico y tratamiento precoz.

Vías de infección

- Hematógena (bacteriemia previa).
- Postraumática.
- Posquirúrgica.
- Posterior a inyección intraarticular.

Agentes más frecuentes

- *S. aureus*: en todas las edades.
- *Kingella kingae* en niños.
- Estreptococos beta-hemolíticos (niños mayores y adultos).

- *H. influenzae*: niños < 5 años (especialmente en niños de 6m a 2a).
- *N. gonorrhoeae*: jóvenes.
- Enterobacterias y no fermentadores: ancianos.
- *Brucella*: condiciones predisponentes específicas.
- *Pasteurella*, *Capnocytophaga*, etc.: mordeduras.

Articulaciones más frecuentemente involucradas

- Rodilla, cadera y hombro.
- Las del tobillo, interfalángicas, codo o muñeca son raras, excepto en la artritis gonocócica, en la tuberculosa o en la posterior a mordeduras.
- Sacroilíaca y esternoclavicular: drogadictos i.v..

Osteomielitis aguda

Se define como una infección de la cortical, de la médula, o de ambas estructuras del hueso.

Vías de infección

- Hematógena (bacteriemia previa).
- Postraumática.
- Posquirúrgica (posprotésica):

Tempranas: Dentro de los 3 meses.

Intermedias: Entre los 3 meses y 2 años.

Tardías: Después de los 2 años.

Hasta 1 año: asociadas a la cirugía.

Después del primer año: prevalece la vía hematógena.

- Por contigüidad (úlceras, infección dentaria, sinusitis, etc.).
- Asociada a isquemia (diabetes, insuficiencia vascular).

Agentes más frecuentes:

- *S. aureus*: en todas las edades.
- SCN: protésicas.
- *H. influenzae*: niños (osteoartritis).
- BGN: infecciones hospitalarias, drogadictos.

- *P. aeruginosa*: trauma punzante.
- Estreptococos y anaerobios: mordeduras, escaras, traumatismos, pie diabético.
- *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*: condiciones predisponentes específicas.
- *Pasteurella*, *Capnocytophaga*, entre otros: mordeduras.

Osteomielitis crónica

Presentan problemas en forma recurrente, son muy difíciles de tratar y raramente el paciente tiene síntomas agudos o fiebre. Las muestras de hemocultivos tienen alto porcentaje de negatividad.

Agentes etiológicos

- *S. aureus*.
- BGN y otros.

Diagnóstico microbiológico

La obtención de una muestra de calidad es el paso inicial del que va a depender la calidad de los resultados microbiológicos que se obtengan. Se deben tener en cuenta algunas consideraciones:

1) Es fundamental evitar la contaminación de las muestras con la microbiota de la piel. Muchos de los microorganismos comensales de la piel pueden ser causa de este tipo de infecciones, sobre todo si están asociadas a implantes.

2) La tinción de Gram es, por el momento, el único método microbiológico de diagnóstico rápido, pero tiene muy baja sensibilidad, aunque gran especificidad.

3) Los resultados de los cultivos de los exudados de fístulas (osteomielitis crónicas) no representan la realidad de lo que ocurre en el interior del hueso. Se debe obtener la muestra por cirugía, llegando al secuestro óseo, sin tocar la fístula.

4) Los implantes retirados se deben enviar para cultivo en caso de sospecha de infección. No hay recomendaciones claras sobre cómo realizar el cultivo de prótesis y material de osteosíntesis. La ventaja de cultivar los implantes radica en que se analiza directamente del lugar de la infección. Los últimos trabajos publicados han demostrado la utilidad de la sonicación y posterior siembra del sonificado para aumentar el rendimiento de los cultivos al liberar el *biofilm* que recubre el implante. El principal inconveniente de este método es su laboriosidad y la facilidad de contaminación, que muchas veces está causada por el difícil manejo de los implantes. La interpretación de los resultados

de los cultivos debe ser cuidadosa y realizarse considerando los resultados obtenidos para el resto de las muestras del mismo paciente.

Obtención, transporte y conservación de las muestras

A la hora de obtener y conservar las muestras que se van a emplear en el diagnóstico de las infecciones osteoarticulares, se deben seguir normas microbiológicas convencionales, con algunas consideraciones.

1. Se debe evitar la toma de muestras de líquido articular con hisopos.
2. En general, todas las muestras se debieran tomar antes del inicio del tratamiento antibiótico. Y si éste ha comenzado, se debiera interrumpir, si es posible, 2 días antes de la toma de muestras. Cuando las muestras se tomen durante una intervención quirúrgica que requiera profilaxis antibiótica, ésta se debe posponer, en la medida de lo posible, hasta que se hayan tomado las muestras para cultivo.
3. Las muestras se deben obtener en las mayores condiciones de asepsia posible, realizando una correcta desinfección de la piel y manipulándolas lo menos posible.
4. Las muestras líquidas deben inocularse en un medio de transporte adecuado, como recipientes con medio de transporte de anaerobios (tipo Tab o similar), o frascos de hemocultivos, en el caso de líquidos claros, siempre conservando una alícuota para la tinción de Gram. Si las muestras resultaran escasas, se podrán enviar en la propia jeringa, con el aire extraído, sin aguja y convenientemente tapadas con tapón estéril.
5. Las muestras de biopsias se deben enviar sumergidas en solución fisiológica, para evitar la desecación.

El envío de las muestras al laboratorio debe ser inmediato. Su procesamiento se debe realizar lo antes posible. Si se tiene que retrasar, (máximo 24h), las muestras deben conservarse refrigeradas entre 2–8°C. En el caso de sospecha de infección por *N. gonorrhoeae*, las muestras deben inocularse inmediatamente, en los medios adecuados (Thayer Martin y agar chocolate). Las muestras en medio de transporte de anaerobios, se deben mantener a temperatura ambiente. Ninguna de estas muestras se debe congelar

Líquido articular

La obtención del líquido sinovial se puede realizar por tres procedimientos: punción y aspiración con aguja (artrocentesis), drenaje por artroscopía o artrotomía (drenaje quirúrgico abierto).

Si se obtiene un volumen suficiente de líquido sinovial, se debe transferir al menos 1ml, en un tubo con anticoagulante, para prevenir la coagulación y facilitar así el recuento de leucocitos. Para el estudio microbiológico hay que evitar el uso de anticoagulantes. Pero en caso de necesidad, son

preferibles la heparina sódica o el polianetolsulfonato sódico al EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o al citrato.

Biopsias

La obtención de biopsias de la membrana sinovial se realiza por artroscopía o artrotomía. La artroscopía es el sistema de elección, siempre que sea posible. Las muestras de biopsia ósea se pueden obtener de forma percutánea o mediante cirugía abierta. La biopsia abierta es preferible a la percutánea, que debe ser guiada por una técnica de imagen. Habitualmente, será el traumatólogo quien obtenga las muestras de biopsias.

Para facilitar la interpretación de los resultados de los cultivos y poder detectar el crecimiento de microorganismos contaminantes, es recomendable el envío de más de una muestra.

Procesamiento

De forma general, a todas las muestras se les realizará tinción de Gram y se sembrarán para bacterias aerobias y anaerobias. Según la sospecha clínica, el tipo de paciente, el tipo de infección, la cantidad de muestra recibida y las peticiones del servicio solicitante, las muestras se procesarán además, para hongos o micobacterias con los métodos adecuados. Al tratarse en general de infecciones graves y muestras de difícil obtención, es recomendable conservar una porción de las muestras refrigeradas durante unos 7 días, por si se necesitaran realizar estudios posteriores.

Las muestras de líquido articular se deben centrifugar cuando el volumen recibido lo permita, para hacer extensiones para tinciones de Gram, Ziehl-Neelsen, entre otros, y para la inoculación en los medios de cultivo a partir del sedimento.

Las muestras de biopsias se deben cortar en varios fragmentos, en una placade Petri estéril, y se deben homogenizar en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución fisiológica o caldo de enriquecimiento. En el caso de sospecha de infección por hongos filamentosos, se deben cortar las muestras en pequeños fragmentos, que se colocarán directamente en los medios de cultivo para hongos (sin trituración). Los extendidos para tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el porta, o bien a partir de la muestra homogeneizada.

Las muestras muy pequeñas y las biopsias óseas duras, pueden inocularse directamente en caldos de enriquecimiento.

Las muestras recibidas en recipientes para anaerobios se extraen con jeringa, previa desinfección del tapón con iodopovidona. Se debe tener la precaución de no introducir aire en el recipiente.

El procesamiento de implantes es más complejo, se debe añadir en el contenedor una cantidad variable de *buffer* de fosfatos estéril, nunca superior a 400ml ni inferior a 50ml. El contenedor se cierra herméticamente y se introduce en un sonicador de baño con agua destilada estéril suficiente

para cubrir el recipiente, sin que éste llegue a flotar. Una vez introducido, se sonica la muestra a 40 kHz durante 5 min. Tras retirar la muestra, se centrifuga el sonicado a 3.000 g durante 20 minutos. Posteriormente, se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1/10 del volumen centrifugado de PBS estéril. Una vez resuspendido, se procede a la siembra del mismo, de forma cuantitativa. Los laboratorios que no disponen de sonicador pueden realizar una siembra similar, tras agitación del recipiente en un vórtex durante 5 minutos.

Medios de cultivo y condiciones de incubación

La inoculación directa de las muestras de líquido sinovial, homogenizados de biopsias y exudados, debe realizarse en medios sólidos convencionales.

Bacterias aerobias

Agar sangre (incubación a 35°C en atmósfera normal).

Agar chocolate (incubación a 35°C en atmósfera, con 5% de CO₂).

Un tubo con caldo tioglicolato (incubación a 35 °C en atmósfera normal).

En el caso de osteomielitis crónica o fractura expuesta, conviene el uso de agar CLDE, Mac Conkey o Levine y medio de Chapman.

En el caso de artritis en niños, conviene inocular un frasco de hemocultivo con una porción del líquido articular (búsqueda de *Kingella kingae*), o mejor aún, destinar una alícuota para el estudio de *Kingella kingae* por PCR.

Tabla 1. Microorganismos implicados, con mayor frecuencia en los distintos tipos de infecciones osteoarticulares. 1. Infecciones articulares.

Tipo infección/tipo de paciente	Microorganismos más frecuentes	Muestras útiles para el diagnóstico microbiológico
Artritis séptica		Líquido articular Biopsia sinovial
Niños y adultos jóvenes	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>K. kingae</i>	
Neonatos	<i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> y enterobacterias	
Adultos	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>	
Ancianos, diabéticos e inmunodeprimidos	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>	

Mieloma múltiple, esplenectomizados, anemia falciforme	<i>S. pneumoniae</i>	
Factores de riesgo o enfermedad gonocócica diseminada	<i>N. gonorrhoeae</i>	
Mordeduras	<i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , anaerobios	
Infecciones de prótesis articulares		Líquido articular, biopsias prequirúrgicas, abscesos, colecciones, biopsias quirúrgicas periimplante y prótesis
Agudas	<i>S. aureus</i> , enterobacterias	
Crónicas tardías	<i>S. epidermidis</i> y otros estafilococos coagulasa negativa (ECN), <i>Corynebacterium</i> spp. <i>P. acnes</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	
Hematógenas	<i>S. aureus</i> y <i>S. pyogenes</i> (piel), <i>S. epidermidis</i> y otros ECN (catéter), <i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> y anaerobios (manipulaciones dentales), Enterobacterias, <i>S. agalactiae</i> , <i>Enterococcus</i> spp. (infección urinaria)	Hematógenas

Tabla 2. Microorganismos implicados con mayor frecuencia en los distintos tipos de infecciones osteoarticulares. 2. Osteomielitis.

Tipo infección/tipo de paciente	Microorganismos más frecuentes	Muestras útiles para el diagnóstico microbiológico
Osteomielitis		Biopsias óseas y de tejidos blandos. Abscesos y colecciones (ver capítulo 7. Infecciones de piel y tejidos blandos)
Adultos	<i>S. aureus</i>	
Espondilitis y sacroileitis	<i>S. aureus</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Brucella</i> spp.	
Osteomielitis por contigüidad, pie diabético, úlceras por presión	<i>S. aureus</i> , enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> , anaerobios	

Infecciones postquirúrgicas o postraumáticas	<i>S. aureus</i> (incluido resistente a meticilina), enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>	
Ancianos	<i>S. agalactiae</i>	
Inmunodepresión o drepanocitosis, mieloma múltiple	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> spp.	
Infecciones asociadas a material de osteosíntesis		Biopsias periimplante, abscesos, colecciones y el propio implante
Adultos y niños	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Propionibacterium acnes</i> , infecciones polimicrobianas	
Reparación de fracturas abiertas	Bacilos gram negativos, <i>P. aeruginosa</i> , micobacterias atípicas, infecciones polimicrobianas	
Complicadas con varias reintervenciones quirúrgicas	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina, <i>Acinetobacter</i> spp. Microorganismos multirresistentes	

Bacterias anaerobias

Se utiliza como base agar *Brucella* o agar Schaedler

Se siembra una placa de agar sangre lacada + vitamina K y un caldo anaeróbico (incubación en anaerobiosis, ver Parte III, capítulo 8).

Las botellas de hemocultivos inoculadas con líquidos articulares se introducen en el sistema automatizado que disponga cada laboratorio.

Para el cultivo de *N. gonorrhoeae* se inocula además una placa de medio Thayer-Martin y se incuba en atmósfera con 5% de CO₂.

El tiempo de incubación de las placas será de 2–7 días, y el de las botellas de hemocultivo y los caldos de enriquecimiento, de 7–10 días. En caso de sospecha de microorganismos de crecimiento lento, este período se alargará convenientemente.

Bibliografía específica

Ariza J, Euba G, Murillo O. Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:380-90.

- Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, et al.** Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:869-82.
- Bouza E, Barberan J.** Infecciones óseas y osteoarticulares. Infecciones asociadas a material de osteosíntesis y prótesis articulares. 1381-96.
- Bouza E, Muñoz P.** Microorganisms responsible for osteoarticular infections. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol.* 1999;13:21-35.
- Brady RA, Leid JG, Costerton JW, et al.** Osteomyelitis: Clinical overview and mechanisms of infection persistence. *Clin Microbiol Newsl.* 2006;28:65-70.
- Cierny G, Mader JT, Penninck JJ.** A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;414:7-24.
- Lew DP, Waldvogel FA.** Osteomyelitis. *Lancet.* 2004;364:369-79.
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al.** Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.
- Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB.** Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:512-23.
- Wilson ML, Winn W.** Laboratory diagnosis of bone, joint, soft-tissue, and skin infections. *Clin Infect Dis.* 2008;46:453-7.

CAPÍTULO 9

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central

Anatomía del sistema nervioso central y patogenia

El cerebro, órgano principal del sistema nervioso central (SNC), está recubierto por dos estructuras protectoras: por fuera, los huesos del cráneo y más interiormente, por membranas llamadas meninges. Las meninges son tres: duramadre (la más externa), aracnoides (la del medio) y piamadre (la más interna) (Fig 1). Entre las meninges y su entorno hay espacios: **epidural**, entre la duramadre y los huesos del cráneo, **subdural**, entre la duramadre y la aracnoides y **subaracnoideo**, entre la aracnoides y la piamadre.

El líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra en el espacio subaracnoideo. Se origina en los plexos coroideos y se desplaza dentro de las cavidades del cerebro y la médula espinal. Las vellosidades aracnoideas se encargan de absorberlo y permitirle su pasaje al torrente sanguíneo.

La infección que ocurre en el espacio subaracnoideo se llama **meningitis**. El ingreso de los microorganismos a este espacio puede producirse por diferentes vías:

1. **Vía hematológica.** Es la más frecuente. Los microorganismos entran al espacio subaracnoideo a través de los plexos coroideos o de otros vasos sanguíneos cerebrales.
2. **Por contigüidad.** Se produce a partir de otro sitio infectado próximo (otitis media, sinusitis).
3. **Por defectos anatómicos.** Los microorganismos ingresan gracias a la presencia de anomalías congénitas, cirugía o trauma.
4. **Por vía intraneural directa.** Es la menos frecuente y se da en casos de virus como el de la rabia o el *Herpes simplex*, que son capaces de “viajar” por los nervios periféricos.

Meningitis

La meningitis es la inflamación de las membranas meníngeas que, como ya se dijo, son membranas que cubren y protegen el cerebro y la médula espinal.

Las meningitis pueden diferenciarse en dos categorías principales: purulentas y asépticas.

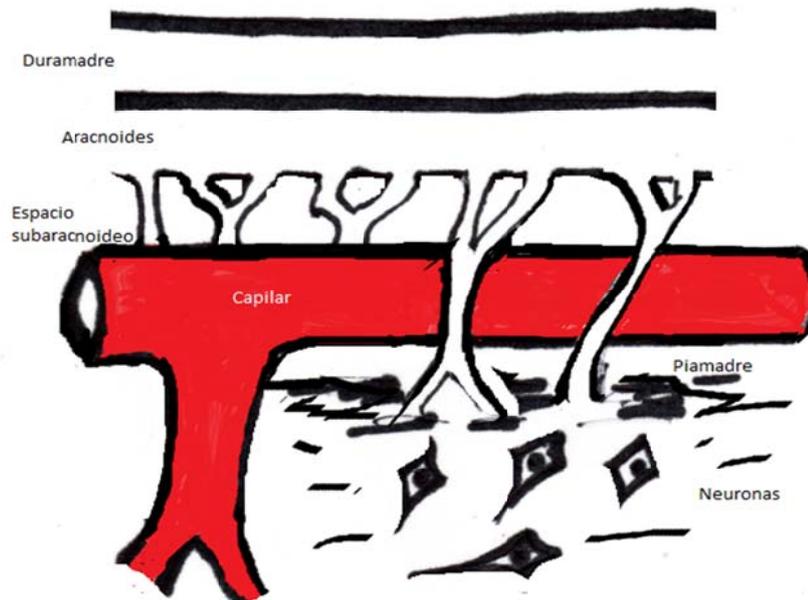


Figura 1. Estructura de las meninges.

Meningitis purulentas

Las meningitis purulentas se caracterizan por la presencia de un exudado inflamatorio agudo, con grandes cantidades de leucocitos polimorfonucleares en el LCR. Estas meningitis habitualmente son de etiología bacteriana.

Meningitis asépticas

Las meningitis asépticas, por el contrario, se caracterizan por un aumento mínimo o moderado de células mononucleares (principalmente linfocitos). No obstante, al igual que las purulentas, pueden presentarse con rigidez de nuca, cefaleas, fiebre, náuseas y vómitos. En general, están asociadas a infecciones de origen viral, aunque también pueden ser causadas por espiroquetas (leptospirosis, neurosífilis) o tumores del sistema nervioso central.

Las meningitis también pueden clasificarse en **primarias** (en pacientes previamente sanos) y **secundarias** (posquirúrgicas, postraumáticas, posteriores a tumores del SNC).

Según su curso se clasifican en agudas y crónicas.

Agudas

Son de presentación abrupta y de curso rápido (menos de 15 días) Generalmente son causadas por bacterias o virus. Se caracterizan por cefaleas, fiebre, vómitos, fotofobia, rigidez de nuca. Su diagnóstico constituye una urgencia microbiológica, puesto que el tratamiento temprano puede evitar complicaciones (convulsiones, hidrocefalia, hipertensión intracraneana) y, eventualmente, la muerte.

Crónicas

Se presentan especialmente en pacientes inmunocomprometidos. El comienzo es insidioso: fiebre, cefaleas, rigidez de nuca, náuseas y vómitos, letargo, confusión. Los síntomas pueden persistir durante un mes o más antes que se llegue a la consulta médica. Pueden ser de etiología parasitaria, fúngica, tuberculosa o sifilítica (neurosífilis).

La edad y otros factores son causas predisponentes no sólo para la adquisición de la meningitis sino también para la presencia de diferentes agentes microbianos. (Tabla 1).

Tabla 1. Etiología de las meningitis bacterianas según la edad y el modo de adquisición

Meningitis primaria de la comunidad				Intrahospitalaria	Postraumática	Posquirúrgica
0-3 años	3m -4 años	>4 a	ancianos			
SGB	Hai	Spn	Spn	<i>E.coli</i>	Spn	<i>S. epidermidis</i>
<i>E.coli</i>	Spn	Nm	Lis	Grupo KES	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Grupo KES	Nm		<i>E.coli</i>	Pae	<i>E.coli</i>	Pae
Lis				<i>Acinetobacter</i>	Grupo KES	<i>E.coli</i>
Efs				<i>S. aureus</i>		Grupo KES

SGB: estreptococo beta hemolítico del grupo B, Spn: Streptococcus pneumoniae, Nm: Neisseria meningitidis, Hai: Haemophilus influenzae, Lis: Listeria monocytogenes, Pae: Pseudomonas aeruginosa, Efs: Enterococcus faecalis, Grupo KES: Klebsiella spp, Enterobacter spp, Serratia spp,

Los recién nacidos tienen una predisposición más elevada a contraer meningitis a partir de una bacteriemia. Esto puede explicarse tanto por su inmadurez inmunológica como por una cierta permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Esta barrera puede verse como una simple membrana lipídica que rodea el cerebro. Sin embargo, ésta es una imagen muy simplificada de lo que significa esta barrera. Hay moléculas

que pueden atravesar membranas lipídicas y que, no obstante, son inactivadas, varios compuestos son degradados enzimáticamente y hay un pasaje selectivo de sustancias. Hay antibióticos que son incapaces de atravesar esta barrera (por ejemplo, cefalotina) y otros que lo hacen sólo cuando existe inflamación.

Los recién nacidos a veces se presentan sin síntomas ni signos específicos. El examen inicial del LCR no permite descartar la presencia de meningitis. De 95 neonatos con cultivo positivo, en un estudio, el 10% tenía menos de 3 leucocitos por mm³.

En los neonatos se realiza el tratamiento empírico inicial aún en casos de baja sospecha clínica y se suspende recién cuando el resultado del cultivo de LCR resulta negativo.

Los agentes causales de la meningitis neonatal temprana (dentro de la primera semana posterior al parto) son *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*. El ingreso de los microorganismos al torrente sanguíneo, y de allí al sistema nervioso central, ocurre intraútero o a través del canal del parto. La meningitis neonatal tardía (entre la segunda semana y los tres meses posteriores al parto) puede ser producida por estos mismos gérmenes, por estafilococos y bacilos gram negativos. En este caso, los microorganismos principalmente son transmitidos por personal del hospital o por familiares.

Los lactantes con meningitis también se presentan con síntomas inespecíficos: fiebre, rechazo a los alimentos, vómitos, letargia e irritabilidad. Los niños mayores, en cambio, manifiestan irritabilidad meníngea con vómitos, fotofobia, cefaleas y rigidez de nuca. Las bacterias más comunes en niños mayores de 3 meses son *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*. *Haemophilus influenzae* después de la introducción de la vacuna para el serotipo b aparece muy raramente, al igual que *E. coli*, *S. agalactiae*, otros estreptococos, *L. monocytogenes* y otros bacilos gram negativos.

Los adultos se presentan con los signos y síntomas típicos, al igual que los niños mayores. En algunos casos se pueden presentar con alteraciones de su estado mental. Entre el 75 y el 90% de los casos son producidos por *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. En los ancianos suelen agregarse *L. monocytogenes* y bacilos gram negativos.

Con menor frecuencia *Mycobacterium* spp. o *Treponema pallidum* (neurosífilis) pueden causar meningitis.

Otros microorganismos que pueden causar meningitis son los virus: Enterovirus, Herpes, Varicela, Rubeola, Adenovirus, Citomegalovirus y algunos hongos como *Histoplasma*, *Coccidioides* y especialmente *Cryptococcus neoformans*. Este último se aísla principalmente en pacientes inmunocomprometidos por leucemia, cáncer, HIV, trasplantes o por medicamentos inmunosupresores.

También, excepcionalmente la pueden producir algunos parásitos: Cisticercos, amebas de vida libre (*Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp.).

Diagnóstico Microbiológico

Toma de muestra

La muestra de líquido cefalorraquídeo es extraída por el médico en forma aséptica por punción lumbar, en por lo menos tres tubos. El material debe procesarse rápidamente. Si no es factible, se deberá mantener a temperatura ambiente el menor tiempo posible. El segundo tubo se utiliza para hacer el recuento celular y el análisis fisicoquímico. Eventualmente y según el criterio clínico, se estudia en el tercer tubo la presencia de hongos, bacilo de Koch, sífilis (VDRL) o virus.

Transporte y procesamiento

La muestra debe llegar al laboratorio con la solicitud de análisis y datos del paciente.

La muestra se centrifuga y del sedimento se efectúan la observación en fresco, la coloración de Gram y la siembra. El sobrenadante se guarda refrigerado para la realización de pruebas serológicas.

a) Examen en fresco: Se coloca una gota del sedimento entre porta y cubreobjetos y se observa con 400x (hongos y parásitos).

b) Examen en fresco con tinta china: Se coloca una gota del sedimento más una gota de tinta china diluida, entre porta y cubreobjetos, en busca de levaduras capsuladas: *Cryptococcus* spp. (Fig. 2). Esta prueba se solicita en pacientes inmunocomprometidos (HIV positivos o trasplantados) y, de ser positiva, constituye diagnóstico de criptococosis cerebral.

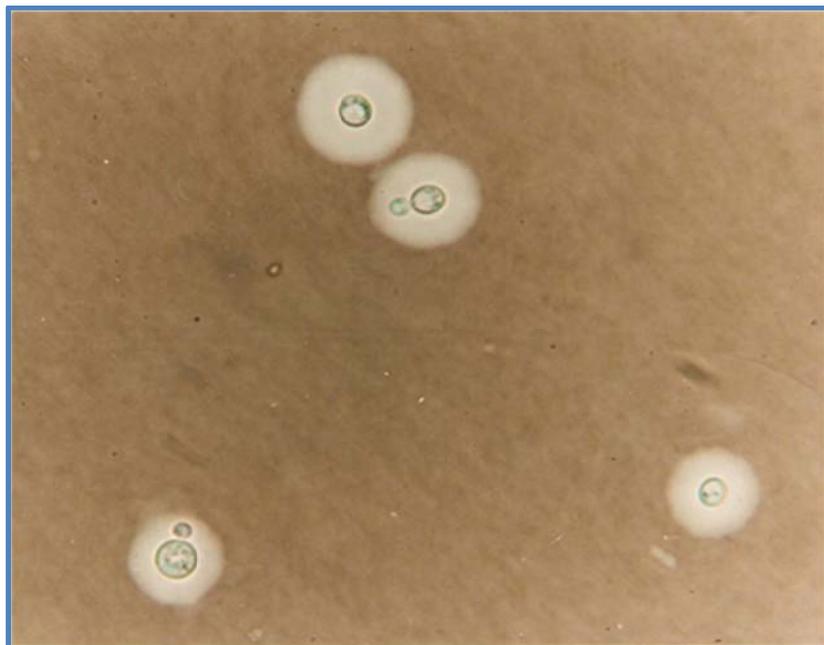


Figura 2. Examen en fresco con tinta china de una muestra de LCR con *Cryptococcus* sp.

c) Coloración de Gram: Se hace un extendido, se fija con alcohol metílico y se colorea con la tinción de Gram. Los extendidos deben hacerse en portaobjetos perfectamente limpios y con técnicas cuidadosas. Se debe efectuar una observación minuciosa con objetivo de inmersión (1000x) y luego informar rápidamente el resultado.

d) Siembra y cultivo

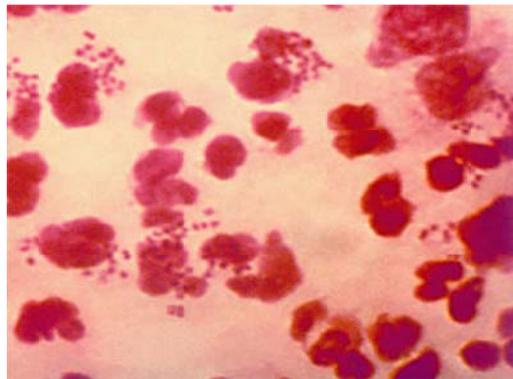
Todos los materiales obtenidos por punción de sitios estériles se siembran en agar sangre, agar chocolate y caldo BHI.

Temperatura de incubación: 35°C.

Atmósfera: 5 a 10% de CO₂.

Se hacen lecturas diarias y observaciones minuciosas, coloración de las colonias que aparecen en el cultivo: Gram y subcultivos ciegos del caldo a las 24h y luego de 7 días. Luego se efectúa la identificación bioquímica de las colonias que se cultivan y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

(a)



(b)

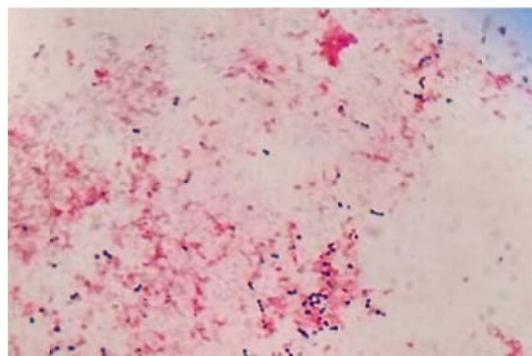


Figura 3. Coloración de Gram de dos muestras de LCR: (a) *Neisseria meningitidis*, (b) *Streptococcus pneumoniae*.

En caso de diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana con cultivo negativo, se pueden realizar técnicas serológicas de identificación. Estas se efectúan directamente del sobrenadante de la centrifugación de la muestra de LCR. Se trata de pruebas rápidas para detectar antígenos, bacterias

íntegras, viables o no. Son pruebas complementarias, es decir no reemplazan al examen directo ni al cultivo. Pueden ser: látex, coaglutinación (CoA) o enzimoimmunoensayo (ELISA). Actualmente, también se emplean técnicas de PCR múltiple que amplifican secuencias específicas de los principales patógenos implicados en meningitis.

Estudio cito-fisicoquímico

Consiste en describir el aspecto macroscópico del líquido (Tabla 2), realizar el recuento celular absoluto y relativo y medir glucosa y proteínas (Tabla 3). Es un estudio del que pueden sacarse conclusiones orientativas respecto de la etiología de la meningitis.

Tabla 2. Características macroscópicas del LCR

Aspecto	Interpretación
Transparente, como cristal de roca	Normal
Turbio	>200 leucocitos/mm ³ , >400 eritrocitos/mm ³ , presencia de microorganismos.
Purulento	Casi siempre se trata de meningitis bacteriana
Sanguinolento	Por punción traumática o hemorragia subaracnoidea reciente ⁵
Xantocrómico (amarillo-anaranjado)	Hemorragia subaracnoidea o en líquidos de neonatos con hiperbilirrubinemia ⁶

Recuento celular

A 0,5ml del líquido se le agrega una gota de ácido acético glacial (destruye los eritrocitos) y se realiza el recuento en cámara de Neubauer. Se cuentan los leucocitos en toda la cámara 0,9 mm³ y se refiere a 1mm³.

La presencia de un coágulo de fibrina anula el recuento por cuanto los leucocitos quedan atrapados en el coágulo y se informaría un recuento con error por defecto.

La presencia de glóbulos de pus debe informarse como tal, pero es otra causa de error en el recuento.

⁵ En la hemorragia subaracnoidea suelen observarse eritrocitos crenados. Es de utilidad la observación de los tres tubos. En caso de punción traumática, la intensidad del color disminuye del primero al tercer tubo y el sobrenadante de la centrifugación es un líquido claro y transparente.

⁶ Cuando la hemorragia subaracnoidea no es reciente, los eritrocitos se destruyen, liberando la hemoglobina, que al ser degradada, confiere ese color al líquido.

El recuento relativo se efectúa del sedimento de la centrifugación. Se hace un extendido de una gota del sedimento en portaobjetos. Se deja secar al aire, se fija con metanol durante 3 minutos y se colorea durante 7 a 10 minutos con colorante Giemsa. Se cuentan polimorfonucleares y linfocitos y se informa el número porcentual, tal como se hace en una fórmula leucocitaria de un extendido de sangre.

Examen químico

Se realiza el dosaje de glucosa y proteínas en el sobrenadante de la centrifugación.

Tabla 3. Estudio fisicoquímico del LCR

Tipo de meningitis	Células/mm³	Predominio de células	Proteínas (g/l)	Glucosa (g/l)
Meningitis bacteriana	200 a 5000	Polimorfonucleares	< 0,45	<60% de la glucemia
Meningitis tuberculosa	100 a 500	Linfocitos	>0,45	<60% de la glucemia
Meningitis viral (aséptica)	10 a 700	Linfocitos	<0,15	>60% de la glucemia

Consideraciones generales

La obtención de cultivos positivos depende de varios factores:

- 1) Toma y transporte de muestra adecuados.
- 2) Siembra rápida y correcta.
- 3) Ausencia de antibiótico antes de la toma de muestra.
- 4) Incubación prolongada.
- 5) Cantidad de muestra (especialmente importante para hongos y micobacterias).

Comentarios

- Dado que la meningitis se asocia a menudo con bacteriemia, se aconseja el envío simultáneo de dos frascos de hemocultivo.
- Cuando el médico sospeche meningitis por micobacterias o meningitis fúngica, deberá indicarlo expresamente y se deberá enviar la mayor cantidad posible de LCR al Laboratorio

de Microbiología. En estos casos se deberán utilizar los medios específicos y prolongarse los tiempos de incubación.

- No se efectúa siembra en medios para anaerobios porque éstos se aíslan sólo excepcionalmente de muestras de LCR.

En consecuencia, rutinariamente, la siembra de una muestra de LCR debe realizarse en agar sangre y caldo BHI, los que deberán ser incubados al aire a 37°C, y en agar chocolate, incubado a la misma temperatura pero en atmósfera de 5% de CO₂ (Fig. 4).

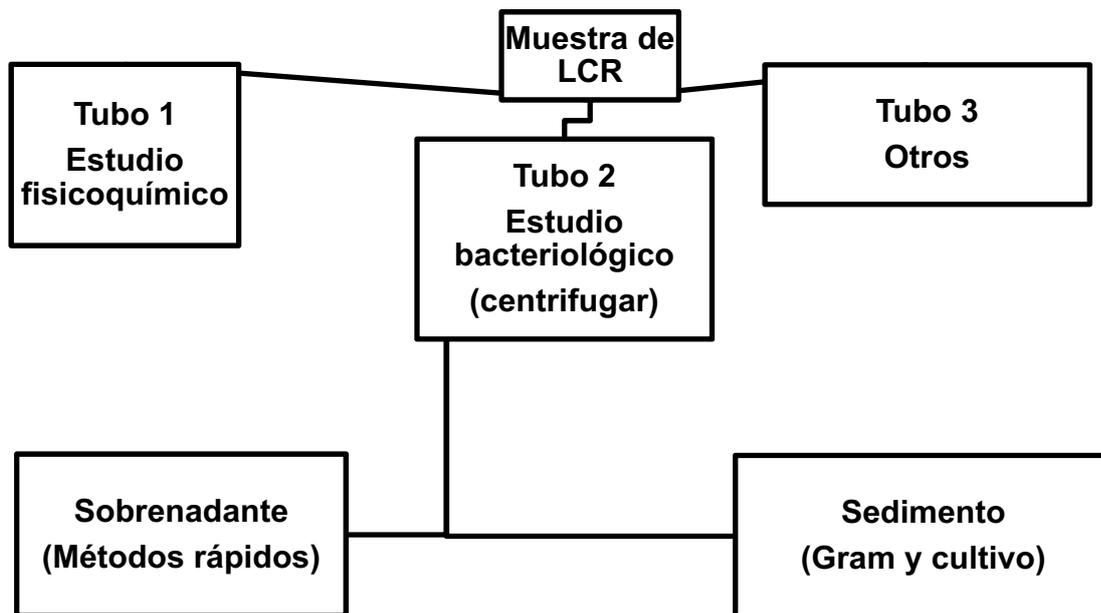


Figura 4. Procesamiento del líquido cefalorraquídeo

Meningitis tuberculosa

La meningitis tuberculosa es una entidad poco frecuente y que tiene que ver con la diseminación de micobacterias a partir del sistema respiratorio. Puede darse tanto en pacientes inmunocomprometidos como en inmunocompetentes. Su presentación se diferencia de las otras meningitis en la presencia de signos de foco. Esto se debe a que se trata de granulomas del sistema nervioso central que vuelcan su contenido en el espacio subaracnoideo. El diagnóstico diferencial, entonces, se realiza respecto a tumores del sistema nervioso central o abscesos cerebrales.

Dado que las muestras suelen ser paucibacilares (pocos bacilos por mm^3), es necesario recolectar el mayor volumen posible de LCR para realizar el diagnóstico. Estas muestras se centrifugan durante 30 minutos a 3.000 rpm y se siembran directamente en los medios adecuados (Löwenstein-Jensen, Stonebrink, medios líquidos automatizados o no) (ver Parte III, capítulo 5 y Apéndice II).

Otras colecciones purulentas del sistema nervioso central

Absceso epidural

Los abscesos epidurales son colecciones purulentas localizadas entre la cubierta exterior del cerebro (duramadre), la médula espinal y los huesos del cráneo o la columna vertebral. Cuando se los encuentra en el área del cráneo se los denomina abscesos epidurales intracraneales, mientras que si están localizados en el área de la columna vertebral, se los llama abscesos epidurales raquídeos. Estos últimos son los más comunes.

La etiología, por lo general, es bacteriana y *S. aureus* es la bacteria más frecuente. También pueden ser de origen fúngico.

Los abscesos epidurales intracraneales pueden generarse por complicaciones de otitis o sinusitis crónicas, mastoiditis, traumatismo de cráneo o cirugía. Los raquídeos por bacteriemia, forunculosis, osteomielitis vertebral o cirugía de columna.

El diagnóstico microbiológico se realiza a partir del material de drenaje del absceso y de hemocultivos. La siembra se realiza en agar sangre, agar chocolate y caldo BHI o tioglicolato. Si bien los anaerobios no se aíslan con frecuencia de estas muestras, conviene realizar una siembra para su búsqueda (ver Parte III, capítulo 7).

Los síntomas pueden ser inespecíficos (fiebre, cefaleas, letargo, náuseas y vómitos), pero suele haber indicios que hacen sospechar este tipo de abscesos: dolor en el sitio de una cirugía reciente que empeora, disminución de la capacidad de movimiento o pérdida de la sensibilidad en cualquier parte del cuerpo.

Empiema subdural

El empiema subdural es una colección purulenta que ocupa el espacio del mismo nombre, delimitado externamente por la duramadre e, internamente, por la aracnoides. Puede ser de consistencia líquida o estar organizado y multiloculado. Puede localizarse a nivel intracraneal o espinal.

En los lactantes y niños menores de cinco años suele presentarse como complicación de una meningitis y en niños mayores, secundariamente, a sinusitis paranasal, otitis media o mastoiditis. La

mayoría de los casos en adultos tienen como antecedente alguna forma de sinusitis. El empiema también puede producirse a través de una bacteriemia. En este caso, el foco primario suele ser pulmonar.

Los gérmenes aislados más frecuentemente son *S. aureus* y los estreptococos del grupo viridans. También pueden aislarse las bacterias anaeróbicas en porcentajes nada despreciables. Por eso, aquí es necesario sembrar las muestras en agar sangre, agar chocolate y caldo BHI o tioglicolato y realizar cultivos en anaerobiosis (ver Parte III, capítulo 7). En niños pequeños son frecuentes *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, aunque después de la aplicación de la vacuna para el serotipo b en forma masiva, este último se aísla muy raramente.

El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefaleas, vómitos, signos de irritación meníngea, deterioro de funciones superiores y signos de foco.

Absceso cerebral y cerebeloso

Son colecciones purulentas intracerebrales que se generan por presencia de bacterias u hongos que invaden parte del cerebro y provocan una reacción inflamatoria.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las cefaleas y signos neurológicos que dependerán de la localización particular del absceso. La fiebre y las alteraciones de la conciencia son muy raras. Es posible que los síntomas sean inicialmente leves y puedan ir progresando en término de días o semanas. Se pueden observar cambios en la conducta en pacientes con abscesos frontales o temporales. Los pacientes con abscesos cerebelosos o del tronco cerebral pueden tener trastornos en la marcha, pueden estar afectados los pares craneales o pueden presentar cefaleas o alteraciones de su estado mental debidas a hidrocefalia. Hasta un 25% de los pacientes presentan convulsiones.

El diagnóstico diferencial incluye tumores cerebrales, meningitis bacteriana, absceso epidural y empiema subdural.

Los microorganismos que causan abscesos cerebrales pueden llegar al cerebro por vía hematógica especialmente provenientes de un foco pulmonar. Se han observado casos en los que las bacterias procedían del corazón (endocarditis) o la zona orofaríngea (caries). También pueden provenir de sitios contiguos como el oído medio, especialmente en el caso de los abscesos cerebelosos. Otras formas de acceder al sistema nervioso central pueden ser el traumatismo o la neurocirugía.

Ciertas condiciones predisponentes favorecen el desarrollo de abscesos cerebrales: inmunodepresión (por ejemplo, SIDA), utilización de corticoides, aplicación de quimioterapia o cardiopatías congénitas.

Los síntomas pueden aparecer lentamente o en forma brusca. Ellos pueden ser fiebre, escalofríos, cefaleas, vómitos, confusión, cambios en la visión, somnolencia, disminución de la sensibilidad, problemas en el habla, crisis epiléptica, entre otros.

Los pacientes trasplantados, receptores de órganos sólidos, tienen predisposición a infectarse por *Nocardia* spp y hongos (*Candida* spp, *Aspergillus* spp.)

En los abscesos postraumáticos o posquirúrgicos son prevalentes los microorganismos que habitualmente colonizan la piel, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y bacilos gram negativos. Los abscesos cerebrales producidos por infecciones contiguas, por su parte, tienen a los estreptococos como principales agentes, aunque también pueden aislarse estafilococos, anaerobios y bacilos gram negativos, frecuentemente como parte de microbiota polimicrobiana. En los casos de diseminación hematológica, los abscesos suelen ser polimicrobianos y en ellos se pueden encontrar estafilococos, estreptococos, anaerobios y bacilos gram negativos del grupo ACEK.

Los procedimientos diagnósticos incluyen la tomografía computada, la resonancia magnética nuclear y los cultivos (hemocultivos y cultivo del material de drenaje, en caso que pueda realizarse). Con el uso de las técnicas modernas, casi cualquier absceso que mida más de 1 cm de diámetro puede ser drenado por aspiración. El cultivo de LCR puede aportar al diagnóstico, pero por lo general se desiste de realizar la punción lumbar por el riesgo de producir una hernia cerebral o ruptura del absceso.

El material de drenaje o el LCR obtenidos se deberán procesar de la siguiente manera:

1. Coloración de Gram (1.000 X)
2. Examen en fresco (400 X), especialmente si se tratara de casos de pacientes trasplantados.
3. Cultivo en agar sangre y caldo BHI en aerobiosis y agar chocolate en atmósfera de 0,5% de CO₂ para recuperación de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos.
4. Cultivo en agar sangre lacada + vitamina K y en caldo anaeróbico, en anaerobiosis.

Bibliografía específica

Brouwer MC, Tunkel AR, Mc Khann GM, et al. Brain abscess. N Engl J Med 2014; 371:447-56.

Brouwer MC, Tunkel AR, van der Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 467-92

Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. Clin Microbiol. Rev 1992; 5: 130-45.

Nau R, Sorgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 858-83.

Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 118-36.

CAPÍTULO 10

Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales

Microbiota habitual del tracto digestivo

En el tubo digestivo existe una microbiota normal que cumple un papel importante en el metabolismo intestinal. Su distribución es heterogénea a lo largo del tracto digestivo y está conformada, a grandes rasgos, como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Microbiota habitual del tracto digestivo

Localización	Microorganismos colonizantes
Mucosa orofaríngea	Anaerobios ($10^8 - 10^{10}$ ufc/ml) Estreptococos del grupo viridans Estafilococos Bacilos gram negativos (en pacientes hospitalizados)
Estómago	Lactobacilos y <i>Candida</i> spp. $\leq 10^3$ ufc/ml
Intestino delgado alto (duodeno)	Lactobacilos y estreptococos
Intestino delgado bajo (íleon)	Igual a intestino grueso, pero con menor concentración de bacterias (10^7 - 10^8 ufc/ml)
Intestino grueso	Anaerobios: $10^{10} - 10^{11}$ ufc/g Enterobacterias: $10^7 - 10^8$ ufc/g Enterococos: $10^5 - 10^6$ ufc/g

En los cuadros 2 y 3 se incluyeron los patógenos más reconocidos como agentes etiológicos de diarrea en el hombre.

No necesariamente las diarreas deben ser infecciosas, también las causas pueden ser tóxicas, metabólicas y dietéticas.

Cuadro 2. Agentes bacterianos de diarrea en el hombre

Patógenos gastrointestinales	Características particulares
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica Enteropatógena Enteroinvasiva Enteroagregativa Enteroagregativa Enteroagregativa Enteroagregativa	
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Shigella</i> spp.	
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> <i>Aeromonas caviae</i>	
<i>Vibrio</i> spp.	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	
<i>Yersinia</i> spp.	Especialmente en climas fríos
<i>Mycobacterium</i> spp.	En inmunocomprometidos
<i>Clostridium difficile</i>	Diarrea asociada a antibióticos
<i>Clostridium</i> spp.	Intoxicación alimentaria por toxinas preformadas
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Pueden producir diarrea como manifestación secundaria de una infección de transmisión sexual
<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	

Cuadro 3. Agentes virales, micóticos y parasitarios de diarrea en el hombre

Tipo de diarreas	Microorganismos	Características particulares
Virales	Rotavirus	Especialmente en invierno
	Agente de Norwalk	
	Norovirus	
	Adenovirus serotipos 40 y 41	
	Pararrotavirus	
	Calicivirus	
	Citomegalovirus	

	Herpesvirus	Pueden producir diarrea como manifestación secundaria de una infección de transmisión sexual
Micóticas	<i>Candida spp.</i>	
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
Parasitarias	<i>Cryptosporidium</i>	
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	
	<i>Giardia lamblia</i>	
	<i>Isospora belli</i>	
	<i>Balantidium coli</i>	
	<i>Dientamoeba fragilis</i>	
	<i>Microsporidium</i>	
	Helmintos	

Diarrea

Normalmente circulan alrededor de 7 litros de líquido por día en el tracto gastrointestinal. Se reabsorbe la mayor parte y quedan unos 200g. Si este peso se ve aumentado, se habla de diarrea. No obstante, hay que tener en cuenta la frecuencia y la consistencia de las deposiciones. Otros signos que se acoplan a la frecuencia y fluidez de la materia fecal son la anorexia, los vómitos, el dolor abdominal y la fiebre.

Definiciones

La diarrea infecciosa es un proceso autolimitado y afebril. Frecuentemente, se resuelve con una alimentación adecuada (alimentos de bajo poder fermentativo) y, en casos de deshidratación, con aporte de líquidos, especialmente sales de rehidratación oral, pues permite el manejo ambulatorio (fuera del hospital). El estudio completo de las diarreas se reserva por su alto costo para determinados casos y para determinado tipo de centros. Cuando se efectúa la búsqueda de todos los agentes causantes de diarrea, se puede llegar a concretar hasta el 80% de los diagnósticos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea es el aumento del número y volumen de deposiciones intestinales, acompañado con la disminución de la consistencia de material fecal, de manera que esta adquiera la forma del envase que la contenga.

Normalmente, se entiende por aumento del número de deposiciones a un número mayor de cinco. Sin embargo, esto depende de la edad del paciente, dado que en lactantes este número suele ser normal.

Por otra parte, si cambia la consistencia de la materia fecal, igualmente se trata de diarrea, aunque el número de deposiciones no aumente en forma considerable.

Coprocultivo

Se entiende por coprocultivo al cultivo de la materia fecal. Este consiste en tomar una porción de materia fecal recién emitida, que se utiliza como tal si se procesa en forma inmediata. De lo contrario, se coloca con hisopo estéril en un medio de transporte y se remite lo más rápidamente posible al laboratorio. Este estudio se practica en el marco de la investigación de diarreas infecciosas.

El tratamiento de las diarreas adherenciales y secretorias se efectúa en forma eficiente, en la mayoría de los casos, con soluciones de hidratación oral con glucosa y sales. Habitualmente, no se requiere de la aplicación de terapéuticas antimicrobianas y, en consecuencia, no es necesario el diagnóstico etiológico para el manejo puntual de cada paciente. Existen sólo casos particulares en los que se debe tomar una muestra de materia fecal para coprocultivo en este tipo de diarreas:

a.- Diarrea severa: Especialmente cuando existen síntomas de disentería (inflamación y ulceración del intestino grueso acompañadas de fiebre, dolor abdominal y diarrea con moco, pus y sangre en materia fecal), diarrea debilitante, síntomas sistémicos o necesidad de hospitalización.

b.- Diarrea crónica: Merece un estudio de evaluación diagnóstica, para diferenciar etiologías infecciosas de las no infecciosas.

c.- Brotes epidémicos.

d.- Diarreas en pacientes inmunodeprimidos (SIDA, oncológicos, entre otros.)

Tipos de muestras, recolección, transporte y procesamiento

1.1. Tipos de muestras y recolección

La muestra debe consistir en heces recién emitidas, recolectadas en frasco de boca ancha estéril o bien tocando, preferentemente, zonas purulentas o sanguinolentas con hisopo estéril. El hisopo se debe introducir luego en un tubo con medio de transporte Cary-Blair. En este medio la muestra puede mantenerse a temperatura ambiente en condiciones óptimas hasta 5 días después de recogida.

En caso de recolectarse las heces frescas en un frasco de boca ancha estéril, la muestra se deberá remitir inmediatamente al laboratorio y procesarse antes de las dos horas.

Estas muestras no se deben refrigerar, puesto que se producen cambios de pH que inhiben ciertos enteropatógenos como *Shigella*.

No se deben aceptar pañales remitidos como muestra, ya que la desecación y contaminación con orina puede dar resultados falsamente negativos (la deshidratación y la acidez de la orina pueden dañar a algunos enteropatógenos)

Otra muestra, aunque menos apta para la recuperación de algunos patógenos como *Salmonella*, es el hisopado rectal. Se toma por introducción de un hisopo estéril en el recto del paciente. También este hisopo se introduce luego en el medio de Cary Blair. Para lubricar el hisopo se lo introduce previamente en el medio de transporte. De este modo, se podrá realizar la maniobra sin dificultad y se evitará la desecación de la muestra.

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

Las muestras para virus se deben recoger en frasco estéril y almacenar en congelador o freezer a -20° C.

Las biopsias intestinales se deben transportar en caldo tioglicolato de sodio.

1.2. Examen directo

No se efectúa coloración de Gram debido a que no aporta nada al diagnóstico, dada la gran diversidad de microorganismos que forman parte de la microbiota habitual del intestino.

El examen directo se efectúa en fresco y con tinción de azul de metileno. Sirve para observar la presencia de leucocitos (reacción inflamatoria), hematíes (sangrado), hongos y parásitos.

Una pequeña muestra de materia fecal, o preferentemente de moco, debe ser colocada entre porta y cubreobjetos con una gota de azul de metileno. Se observa al microscopio después de 2 o 3 minutos con aumento de 400X. Para una óptima observación, esta técnica debe ser realizada dentro de los 20 minutos de tomada la muestra.

1.3. Siembra

El hisopo se introduce en 1 ml de caldo nutritivo, se agita, y a partir de éste, se siembran los distintos medios:

a) **Agar sangre con ampicilina:** Para la búsqueda de *Aeromonas*. Se incuba al aire a 37° C y se examina a las 24 y a las 48 horas.

b) **Agar SS** o XLD: Se utilizan para la búsqueda de *Shigella* y *Salmonella*. Se incuban al aire a 37° C y se examinan a las 24 y a las 48 horas.

c) **Agar MacConkey con sorbitol:** Para el estudio de las enterobacterias en general y, en especial, para la búsqueda de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 sorbitol negativa. También puede servir para aislar *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y otras bacterias sorbitol negativas como: *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*, *Aeromonas* spp. y *Kluyvera* spp. Se incuba al aire

a 37° C y se examina a las 24 y a las 48 horas. La desventaja de este medio es que luego de 24 horas a 37°C, se alteran las características culturales de las colonias.

d) Como medio alternativo para la búsqueda de EHEC, está el agar cromogénico para O157, que mantiene estables las características culturales de las colonias por más de 24 horas. La desventaja es su elevado costo. También puede usarse el agar de MacConkey con sorbitol, telurito y cefixima (SCMT), que inhibe la microbiota asociada, aunque puede inhibir también algunas cepas de EHEC. Ambos medios se incuban durante 24 horas a 37° C.

e) **Medio de Skirrow modificado** (agar CPY). Se siembra para la búsqueda de *Campylobacter* spp. termotolerantes. Se incuba en jarra a una atmósfera de **3-5% de O₂** (con sobre comercial generador de microaerobiosis) **a 42° C** por 48-72 horas.

En muestras de pacientes inmunocomprometidos se adiciona agar sangre sembrado por filtración, para la búsqueda de cepas de *Campylobacter* spp., sensibles a los antibióticos del medio selectivo o a la temperatura de 42°C. Se incuba en jarra, con generador de microaerobiosis a 37° C por 96 h.

f) **Caldo selenito**, para la búsqueda de *Salmonella* spp. A las 18 horas se hacen subcultivos a medio de Hektoen o a SS. El medio de Hektoen o el SS se examinan a las 24 horas y se descartan si no se ven colonias sospechosas de *Shigella* o *Salmonella*.

g) **Agua peptonada alcalina modificada**. Se emplea para buscar por enriquecimiento posibles portadores de *Vibrio cholerae*. Se incuba a 37° C y se repica a las 6 a 8 horas en agar TCBS, el cual se incuba a 37° C y se examina a las 24 y 48 h. En caso de urgencia, se repica también en agar sangre para ganar un día en la identificación del germen.

h) **Agar TCBS**, para la búsqueda precoz de *Vibrio cholerae*, con y sin el previo enriquecimiento.

El esquema de trabajo se resume en el cuadro 1, y en las figuras 2 y 3.

1.4. Procesamiento

El procesamiento de las muestras de materia fecal para el estudio bacteriológico se describe en forma esquemática en el Cuadro 4 y en la Figura 1.

Cuadro 4. Procedimiento habitual del coprocultivo

Para la búsqueda de bacterias comunes, se siembra en:	
•	Agar EMB (MacConkey, CLDE, XLD u otro).
•	MacConkey con sorbitol (EHEC = sorbitol negativo).
•	Agar SS o Hektoen para <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .

<ul style="list-style-type: none"> • Agar sangre suplementado con ampicilina para <i>Aeromonas</i>⁷.
<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Selenito para <i>Salmonella</i>.
<ul style="list-style-type: none"> • Medio de Skirrow o similar, para <i>Campylobacter</i>⁸.
<p>La búsqueda de otras bacterias se realiza según el contexto clínico o epidemiológico del caso. Existen medios especiales. Por ejemplo, TCBS9 y agua peptonada alcalina para <i>Vibrio</i>, medio CIN (agar con cefsulodina, irgasan y novobiocina) para <i>Yersinia</i>, entre otros.</p>
<p>Salvo el Caldo Selenito, los medios se incuban durante 24-48 h. a 35° C. El Caldo Selenito luego de 18h. de incubación, se subcultiva en agar SS.</p>
<p>Con las colonias aisladas, se realiza la identificación bioquímica, pruebas serológicas, y se determina la sensibilidad a los antimicrobianos.</p>

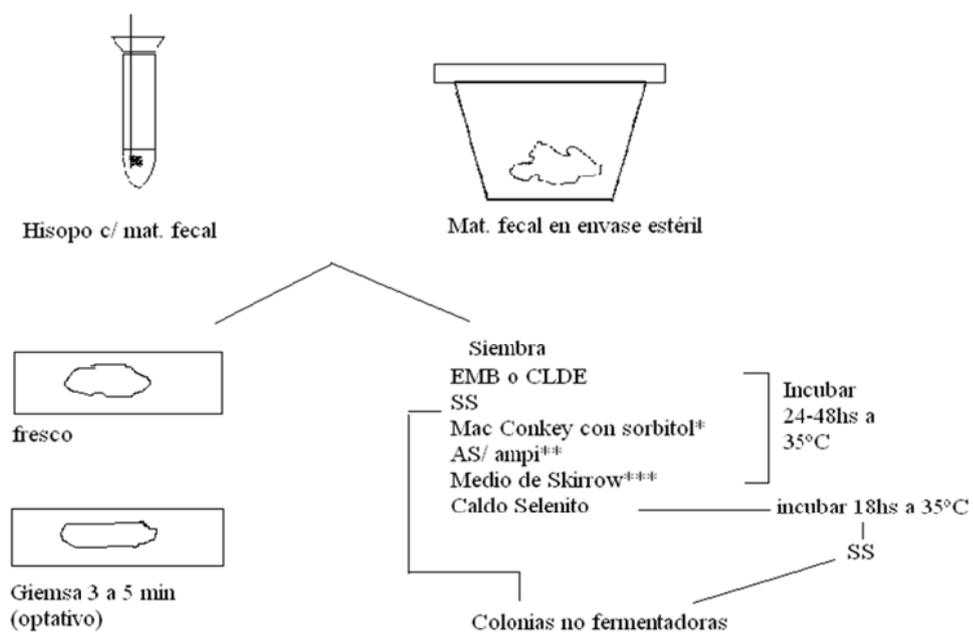


Figura 1. Procesamiento del coprocultivo

1.5. Estudios de sensibilidad antimicrobiana

Los agentes a probar e informar de rutina con enterobacterias aisladas de coprocultivo son: ampicilina, ampicilina-sulbactam, trimetoprima-sulfametoxazol, cloranfenicol y nitrofurantoína

⁷ Se le efectúa la prueba oxidasa a varias colonias hemolíticas del agar sangre. Si da positiva, se completa la marcha para *Aeromonas* y *Vibrio*: TSI, LIA, SIM, ODC, citrato, esculina, bilis esculina, Voges-Proskauer, DNasa, Cloruro de sodio 6,5 % y antibiograma. Lo mismo se realiza con colonias no hemolíticas y con las no fermentadoras del MacConkey sorbitol.
⁸ A las colonias que hubieran crecido en medio de Skirrow, se les realiza un examen en fresco. En caso de verse formas móviles compatibles con *Campylobacter*, se les efectúa una marcha bioquímica y un antibiograma.
⁹ Las colonias amarillas grandes del TCBS se deben reaislar en agar sangre con el objeto de efectuarles la prueba de oxidasa.

(furazolidona). Ciprofloxacina podrá ensayarse, pero se informará sólo en adultos, niños > 12 años, o cepas multirresistentes.

Otras drogas pueden ser apropiadas para informar en casos de multirresistencia, o para obtener datos taxonómicos y/o epidemiológicos (búsqueda de marcadores de resistencia).

Para *Campylobacter* se ensayan ampicilina, eritromicina, ácido nalidíxico, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, nitrofuranos, tetraciclina, cefotaxima, norfloxacina o ciprofloxacina. Algunos de estos antibióticos pueden orientar a la identificación de especies.

2.6. Informe

Examen directo: Se informa si no se ven o se ven escasos o abundantes leucocitos, hematíes, parásitos o levaduras.

Cultivo negativo: Debido a la distinta complejidad con que puede realizarse el coprocultivo, cuando el resultado es negativo, se debe indicar: "se aísla microbiota mixta o polimicrobiana habitual" y se debe decir cuáles fueron los microorganismos estudiados que se descartaron. Por ejemplo: "no se aisló *Salmonella* spp., ni *Shigella* spp., ni *Aeromonas* spp., ni EHEC, ni *Campylobacter* spp."

Si crece únicamente *Escherichia coli*, previo descarte de EHEC, se informará que se aísla *Escherichia coli* y que se guarda la cepa por si se necesitan estudios posteriores. En lactantes o menores de un año, se puede investigar a pedido médico, si una cepa de *Escherichia coli* es EPEC, informándose de todas maneras sin antibiograma, pero guardando la cepa en heladera, por si se requiere el estudio de sensibilidad. Esto es muy útil, sobre todo en pacientes internados (brote intrahospitalario).

Todo aislamiento de *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. y *Campylobacter* spp. se debe informar con antibiograma. Las diarreas por *Salmonella* no deben tratarse con antibióticos, a menos que el paciente presente un cuadro de fiebre entérica, con bacteriemia, en cuyo caso se informará el antibiograma.

Diagnóstico microbiológico de los principales patógenos gastrointestinales

Diagnóstico de *Shigella*

A toda colonia no fermentadora de sorbitol aislada del agar MacConkey sorbitol o incolora (no fermentadora) del agar XLD, Hektoen o SS, se le efectúa una marcha de acuerdo al tamaño de la colonia: TSI, LIA, (Agar Lisina Hierro) y SIM (SH₂-Indol-Movilidad). Lo mismo se realiza si se aísla una

colonia blanca en el agar cromogénico para O157. Si el patrón bioquímico corresponde a *Shigella*, se completa con agar acetato y se efectúa antibiograma y serología para *Shigella*.

Diagnóstico de *E. coli*

Los distintos serotipos de *E. coli* pueden producir diarrea por diversos mecanismos, ya que poseen distintos factores de virulencia. Actualmente, se han dividido en cinco grupos que pueden causar enfermedad diarreica: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteropatógena propiamente dicha (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAgEC) y *Escherichia coli* enteroadherente (EAAdEC).

Diagnóstico de *Escherichia coli* enterohemorrágica

EHEC suele provocar diarrea acuosa o diarrea sanguinolenta. Frecuentemente, el paciente presenta dolor abdominal, pero en general, sin fiebre. Es el agente causal del síndrome urémico hemolítico o púrpura trombocitopénica trombótica. No obstante, también se la puede encontrar en pacientes asintomáticos (portación asintomática).

El serotipo más frecuente es el O157:H7. Las bacterias de este serotipo no fermentan el sorbitol, o lo hacen lentamente, y por ello se las identifica en el agar MacConkey sorbitol. Por el contrario, la mayoría de las bacterias que se encuentran en heces, fermentan el sorbitol, mientras que EHEC O157:H7 no lo hace.

A las colonias incoloras en este medio se les realizan pruebas bioquímicas confirmatorias de *E. coli* (TSI, LIA, SIM) y se les efectúa serología para detectar el antígeno O 157.

Si la serología es positiva, se completa la marcha con ODC, citrato, β -glucuronidasa y se efectúa la detección del antígeno H7. Si la serología es negativa y las pruebas bioquímicas corresponden a *Escherichia coli*, se realiza la prueba de β -glucuronidasa, para descartar la presencia de una EHEC.

Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

La investigación se realiza en casos muy puntuales: neonatos, lactantes menores de un año, cardiopatas, brotes intrahospitalarios o diarreas crónicas severas, como por ejemplo, en los pacientes con SIDA. Comprenden un grupo de 21 serotipos de *E. coli*. Se utilizan primero antisueros polivalentes y luego los monovalentes.

Diagnóstico de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

Estas cepas pertenecen a unos 11 serotipos. Dan negativa la prueba de la lisina y son generalmente inmóviles, poco sacarolíticas y agasógenas. Algunas veces pueden dar reacción cruzada de aglutinación con el antígeno O de *Shigella*.

Recientemente, se ha propuesto una prueba de enzimoimmunoensayo, para detectar las proteínas de membrana externa responsables de la invasión y el empleo de sondas, para detectar los genes que las codifican.

Si se sospecha por el cuadro clínico, presencia de leucocitos en el examen directo y pruebas bioquímicas compatibles, la cepa se debe enviar a laboratorios de referencia, para que le realicen las correspondientes pruebas de invasividad en animales o en cultivos celulares.

Serotipos EIEC: 28 ac, 29, 42, 11 ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164, 167.

Diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Se usan equipos comerciales para detección de la toxina LT. Las colonias sospechosas de *E.coli* se suspenden en una solución extractiva por 30 minutos a 37°C y luego se le realiza una prueba de coaglutinación para detectar la toxina.

Diagnóstico de *Salmonella*

En la Tabla 1 se describen las pruebas bioquímicas que permiten separar las especies de enterobacterias no fermentadoras de lactosa. A toda colonia sospechosa de *Salmonella* (negras, debido a la producción de SH₂ en el agar SS, XLD o Hektoen) se le efectúa un *screening* mínimo con LIA + TSI + citrato + SIM y, luego, si las pruebas bioquímicas son compatibles, se le completa la marcha con ONPG y malonato y se les realiza un antibiograma.

Luego se efectúa la confirmación serológica con los antisueros polivalentes OMA y OMB. En la Tabla 2 se describen las pruebas bioquímicas que permiten diferenciar a *Salmonella* de otras bacterias productoras de SH₂.

En caso de dar positivas las pruebas de LDC y SH₂ y no obtenerse aglutinación con antisueros polivalentes OMA y OMB, se recomienda efectuar serología para *Salmonella* Paratyphi C o *S. Typhi*. Para ello, se debe aglutinar con suero anti-Vi. Si éste fuera positivo, se debiera suspender la colonia en solución fisiológica, calentar a baño maría 30 minutos (para romper el antígeno capsular Vi) y realizar la prueba serológica. Simultáneamente, se deben realizar las pruebas de rojo de metilo, Voges Proskauer, malonato y ONPG para descartar las otras dos bacterias que pueden dar positiva la prueba de descarboxilación de la lisina: *Salmonella arizonae* y *Edwardsiella tarda*.

Tabla 1. Características y pruebas bioquímicas de enterobacterias no fermentadoras de lactosa más frecuentes en coprocultivos.

Microorganismo	TSI	Ind	Mov	VP	Cit	AC	LDC	ODC	FA	GEL	Ure	Pol	Nit
<i>Shigella</i> spp. (A,B,C)	HO/H sin gas ni SH ₂	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
<i>Shigella sonnei</i> (D)	HO/H sin gas ni SH ₂	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	S	S
<i>Escherichia coli</i>	HO/H o H/H sin SH ₂	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	HO/H gas o H/Hgas c/s SH ₂	+	+	-	-/(+)	+	-	-	+	+	+	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	HO/H gas c/s SH ₂	-	+	-	+/ (-)	+	-	+	+	+	+	R	R
<i>Proteus penneri</i>	HO/H gas o H/Hgas c/s SH ₂	-	+	-	-	+	-	-	+	+/-	+	R	R
<i>Morganella morganii</i>	HO/H gas c/s anillo de SH ₂	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	HO/H sin gas ni SH ₂	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	HO/H sin gas ni SH ₂	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+/-	R	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	HO/H sin gas ni SH ₂	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	R	R

TSI: H acidez. OH alcalinidad. IND: indol. Mov: movilidad. VP: Voges-Proskauer. Cit: citrato de Simmons. AC: acetato. LDC: lisina descarboxilasa. ODC: ornitina descarboxilasa. FA: fenilalanina. GEL: gelatina. Ure: ureasa. Pol: sensibilidad (S) o resistencia (R) a polimixina B. Nit: sensibilidad (S) o resistencia (R) a nitrofuranos.

Tabla 2. Características diferenciales de *Salmonella entérica* subsp. *Entérica*, respecto a otros microorganismos similares.

Microorganismo	TSI	SH ₂	GAS	Ind	RM	VP	Cit	LDC	Ure	AC	MAL	GEL	ONPG	Mov
<i>Citrobacter</i> grupo <i>freundii</i>	H/H OH/H	+/-	+	-	+	-	+	-	80	-/+	-	+	+	+
<i>Citrobacter koseri</i>	H/H OH/H	-	+	+	+	-	+	-	75	-/+	-	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhi	OH/H	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	OH/H	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> (no Typhi)	OH/H	+	+	-	+	--	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	OH/H	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> SH ₂ (+)	H/H OH/H	+	+	+	+	-	-	+/-	-	+	-	-	+	+/-

TSI: H acidez, OH alcalinidad, SH₂: producción de SH₂ en el TSI, GAS: producción de gas en el TSI, Ind: indol, RM: rojo de metilo, VP: Voges-Proskauer, Cit: citrato de Simmons, LDC: lisina descarboxilasa, Ure: ureasa, AC: acetato, MAL: malonato, GEL, ONPG: O-nitrofenilgalactósido, Mov: movilidad.

Serotipificación somática

Luego de la confirmación serológica con los antisueros polivalentes OMA y OMB, se efectúa una aglutinación en portaobjetos con los antisueros O específicos (monovalentes).

Una aglutinación fina y débil con todos los antisueros hace sospechar la condición de rugosidad de la cepa. Por lo tanto, siempre es indispensable enfrentar el aislamiento con solución de NaCl (2 g/L), para demostrar que la cepa no autoaglutina, antes de realizar el ensayo con los antisueros monovalentes.

Si se produce una aglutinación con el antisuero polivalente OMA o con el OMB, se prueban los monovalentes somáticos correspondientes a cada uno de ellos.

De ser positivo alguno de los monovalentes, se procede a efectuar la serotipificación flagelar.

Serotipificación flagelar

Para realizar una aglutinación flagelar es conveniente estimular la producción de flagelos de la bacteria, para lo cual se deben hacer no menos de cuatro pasajes por un medio especial (medio de

Craygie), luego de lo cual se repica a un caldo nutritivo (5 ml) y se incuba toda la noche. Se adiciona 5 ml de solución de formol para que los flagelos queden rígidos y se incuba una hora a 37°C.

Luego se coloca una gota de los anticuerpos flagelares polivalentes (por ejemplo, HS-1, HS-A, HS-B y HS-C del Instituto Malbrán). Se le agrega a cada tubo 1 ml de la suspensión formolada de la bacteria. Se incuba durante 60 minutos a 50°C y se registra la aglutinación en flóculos.

Si la aglutinación flagelar concuerda con la somática y pertenece a alguno de los tres serotipos más frecuentes buscados, se realiza la aglutinación con los monovalentes flagelares y se confirma la serovariedad.

Diagnóstico de *Campylobacter*

Características generales

Se trata de bacilos gram negativos curvos (en forma de S) microaerófilos estrictos (desarrollan en presencia de 3 a 5% de O₂). Presentan un flagelo único en uno o ambos extremos. En cultivos de varios días (más de tres), degeneran en formas esféricas u ovoides que han perdido su viabilidad.

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni* es uno de los agentes causales de diarreas agudas. Esta especie es considerada como la más virulenta, por su mayor resistencia a la fagocitosis. Luego le sigue *Campylobacter coli*, que también es penetrante, pero la diarrea que produce es más benigna. Ambos se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de un amplio grupo de animales: vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres y domésticos y, principalmente, en todas las variedades de aves de corral y silvestres, a las cuales se han adaptado perfectamente. Es por ello que su temperatura óptima de crecimiento es de 42°C-43°C. Se considera que el 60% de los pollos son portadores de *Campylobacter*.

Campylobacter upsaliensis, se aísla raras veces a partir de diarreas. Produce bacteriemias en huéspedes inmunocomprometidos. En las heces se aísla por ultrafiltración, las placas se incuban a 37°C y el medio no debe llevar inhibidores, como cefalosporinas, ya que este microorganismo es sensible a estos antibióticos y a la temperatura.

Rara vez se aíslan otras bacterias de este género a partir de muestras clínicas humanas y en algunos casos su rol patogénico aún no está bien dilucidado.

Diagnóstico de laboratorio

Muestras

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.

Examen microscópico directo.

El examen en fresco que se utiliza para la búsqueda de leucocitos, sirve también para ver formas bacilares curvas y espiraladas, móviles (movimientos en espiral o en tirabuzón). Esta observación tiene un valor predictivo superior al 80%.

Siembra

Se utiliza el medio de Skirrow modificado por el agregado de FBP, extracto de levadura, cefoperazona y vancomicina.

Se incuba por espacio de 48 horas en jarra a temperatura más elevada (42°-43°C), en atmósfera de microaerobiosis (3–5% de O₂) producida por un generador especial. Se usan sobres generadores comerciales para el aislamiento de *Campylobacter* spp. Estos sobres, similares a los utilizados para el cultivo anaerobio proporcionan una atmósfera de aproximadamente 3 a 5% de oxígeno y 5 a 12% de dióxido de carbono.

La jarra con la vela encendida normalmente no sirve para lograr el desarrollo de *Campylobacter*. La combustión de la vela proporciona una atmósfera de aproximadamente 17-19% de oxígeno y 4-10% de dióxido de carbono. Sin embargo, podría utilizarse sólo para el aislamiento primario de *Campylobacter* spp. si se incluye al medio de cultivo un suplemento reductor llamado FBP (sulfato ferroso, metabisulfito de Na, y piruvato de sodio al 0,5/1.000 p/v).

En el caso de tratarse de un paciente inmunocomprometido, se recomienda la siembra por filtración, para lo cual se coloca un ultrafiltro de 0,45 µm sobre una placa de agar sangre. Se toca varias veces el centro del filtro con el hisopo cargado de material. Se deja 30 minutos y con una pinza se despega cuidadosamente el filtro. Luego se efectúan las estrías. Las campilobacterias, por ser muy delgadas, atraviesan el filtro. Por el contrario, quedan retenidas enterobacterias, cocos gram positivos, levaduras, entre otras. La incubación se efectúa en microaerobiosis a 37°C por 72 h y los cultivos se revisan a las 48 h.

Identificación

Las colonias visibles habitualmente aparecen en los medios en 24 h a 42°-43°, y en 48 h a 37° para *C. jejuni* y *C. coli*. En ocasiones, el crecimiento tiene lugar luego de 72-96 h de incubación.

Las placas se examinan a las 48 horas. Las especies termófilas de *Campylobacter* 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. Muchas veces 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 un examen en fresco, observándose las formas características espiraladas y esféricas o células en división unidas, semejando las alas de una gaviota, muy delgadas. Se pueden ver también sus movimientos en espiral o rotación alrededor de su eje.

Se realizan, además, las pruebas de catalasa y oxidasa. Ambas pruebas son positivas cuando se utiliza un inóculo abundante.

La identificación final se realiza a través de otras pruebas bioquímicas y serológicas (látex).

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

El método de elección es el epsilométrico. Se prueba de rutina la sensibilidad a ampicilina y eritromicina. Eventualmente, se ensayan también tetraciclinas, furazolidona, cloranfenicol, gentamicina, cotrimoxazol y norfloxacin.

El medio utilizado es agar Mueller-Hilton, + 5% de sangre ovina. Se efectúa una suspensión de un cultivo de 24 o 48 horas en caldo hasta una turbiedad equivalente al tubo N° 1 de la escala de McFarland. Se incuban en microaerobiosis (los termotolerantes a 42°C, las otras especies a 37°C) por el término de 48 h.

Diagnóstico de *Aeromonas* y *Plesiomonas*

La búsqueda de *Aeromonas* se efectúa utilizando agar sangre + 20 µg/ml de ampicilina (ver Apéndice II) dado que la mayoría de las especies enteropatógenas de *Aeromonas* son resistentes a este antibiótico (excepción: *Aeromonas trota*).

Las placas se deben incubar 48 horas para poder ver mejor la hemólisis, ya que *Aeromonas* produce las hemolisinas al final de la fase logarítmica y en la fase estacionaria de crecimiento. *Aeromonas* forma colonias grandes, elevadas, beta-hemolíticas. A las colonias hemolíticas se les efectúa una prueba de oxidasa. Si ésta es positiva, se efectúan las pruebas de descarboxilasas, Voges Proskauer, fermentación de azúcares e hidrólisis de esculina (ver Parte III, Capítulo 2).

Plesiomonas shigelloides forma colonias brillosas, lisas, no hemolíticas en agar sangre. En agar SS da colonias transparentes al igual que *Shigella*. Para su aislamiento no debe utilizarse el medio para *Aeromonas* porque contiene ampicilina y *Plesiomonas* es sensible a ese antibiótico. En el TSI da alcalinidad en el pico y acidez en el fondo, sin SH₂. Semeja ser una especie de *Shigella*, pero es móvil y oxidasa positiva. Da positivas las pruebas de ADH, LDC y ODC.

Diagnóstico de especies de *Vibrio*

Vibrio cholerae

Para su búsqueda a partir de deposiciones coleriformes se siembra una placa de agar TCBS con la muestra y un tubo con agua peptonada alcalina. Este último se incuba durante 6 a 8 horas y se subcultiva en agar TCBS y agar sangre.

V. cholerae forma colonias amarillas sin SH₂ a las 24 horas de incubación en agar TCBS. La alta concentración salina inhibe parte de la flora fecal asociada. A las colonias amarillas del TCBS agar se les realiza una coloración de Gram, para asegurarse de que se trata de bacilos gram negativos, la prueba de TSI y una siembra en una placa o tubo en pico de flauta de agar nutritivo. Este agar debe ser agar Brucella o Columbia y no agar Mueller Hinton ya que aquí también podrían crecer vibriones

no coléricos. Del desarrollo en este agar se realiza la prueba de oxidasa. Ésta no se debe hacer de medios que bajen mucho el pH ya que da resultados falsamente negativos. De este desarrollo también se realiza la prueba de aglutinación con antisueros antivibrio grupo O1 y O139 (Ogawa, Inaba, e Hikojima) para separar los aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 de los no O1 u O139.

Otras especies de *Vibrio*

V. fluvialis, *V. hollisae*, *V. mimicus* y *V. parahaemolyticus* también son agentes de diarrea en el hombre. Frecuentemente, esta infección se adquiere por consumo de agua salada o dulce, o ingesta de frutos de mar contaminados. Estas bacterias desarrollan en TCBS formando colonias verdes excepto *V. fluvialis* que produce colonias amarillas (ver Parte III, Capítulo 2).

Diagnóstico de *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolítica*

Los miembros del género *Yersinia* han sido reclasificados en la familia *Enterobacteriaceae* porque son bacilos gram negativos anaerobios facultativos oxidasa negativos, fermentan la glucosa y reducen los nitratos a nitritos. Las especies móviles sintetizan flagelos peritricos. *Yersinia enterocolítica* y *Yersinia pseudotuberculosis* pueden ser cocobacilos, pero son generalmente bacilos relativamente grandes de 0,5 a 1 por 1 a 2 μM . Deben diferenciarse de *Morganella morganii* anaerógena con SH₂ negativo y del bacilo de la peste (*Yersinia pestis*).

Cuando se recupera por primera vez de las heces, *Yersinia pseudotuberculosis* puede descartarse como una especie de *Morganella morganii*, miembro normal de la flora fecal, porque ambos son lactosa negativos, ureasa positivos y dan alcalino/ácido en el TSI. Además son lisina negativos. Las pruebas diferenciales son movilidad a 22°C y fenilalanina.

La movilidad y la prueba de la ureasa son importantes para separar *Yersinia enterocolítica* y *Yersinia pseudotuberculosis* de *Yersinia pestis*.

La actividad de ornitina descarboxilasa, producción de indol y fermentación de sacarosa se ven en *Yersinia pseudotuberculosis* pero no en *Yersinia enterocolítica*.

La identificación bioquímica puede confirmarse con aglutinación en sueros específicos para tipificación en centros de referencia.

CAPÍTULO 11

Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares

Anatomía del ojo

El globo ocular está conformado por una capa externa llamada esclerótica, fibrosa, blanca y gruesa, con una parte anterior transparente, llamada córnea, no vascularizada. Por detrás de la córnea se encuentra la cámara anterior ocupada por el humor acuoso, que es una sustancia transparente y más atrás, la cámara posterior que contiene el humor vítreo, que es una sustancia gelatinosa. Por detrás está el cristalino.

Desde la superficie ocular y hacia los párpados se encuentra una membrana mucosa llamada conjuntiva. En el hemisferio posterior se hallan la coroides y la retina. Por fuera del ojo está el sistema lagrimal: las glándulas lagrimales, los conductos lagrimales y el saco lagrimal.

Microbiota habitual de la conjuntiva

Como microbiota habitual conjuntival, podemos encontrar escasas concentraciones de estafilococos coagulasa negativos, lactobacilos y cocos anaerobios. Esporádicamente pueden colonizar esa zona *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y, más raramente, enterobacterias y estreptococos.

Patogenia de las infecciones oculares

El ojo tiene mecanismos de defensa mecánicos: pestañas, párpados, destinados a evitar el ingreso de cuerpos extraños. Las secreciones lagrimales, por su parte, a través de la lisozima y las inmunoglobulinas de tipo A (IgA), ejercen una acción bacteriostática o bactericida que impide el ingreso de bacterias y otros microorganismos. La ruptura de las barreras por trauma o cirugía, son la forma más frecuente en que los microorganismos acceden a las estructuras externas o internas del

ojo. También pueden ingresar por vía sanguínea, o menos frecuentemente, por contigüidad desde los senos paranasales.

Infecciones oculares: clínica, epidemiología y diagnóstico microbiológico

Es fundamental establecer el diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares para poder guiar el tratamiento, ya que las manifestaciones clínicas, por lo general, no son específicas. La rapidez de este diagnóstico es crucial, por cuanto la respuesta inflamatoria puede conducir, en muchos casos, a complicaciones importantes de la visión.

Blefaritis

Es la infección localizada en los párpados, que puede progresar hacia la conjuntiva, produciéndose una blefaroconjuntivitis.

Puede ser de etiología bacteriana o viral. Entre las bacterias, las más frecuentes son los estafilococos y entre los virus el *Herpes simplex* (HSV).

Se caracteriza por dolor, ardor, a veces formación de una colección purulenta y costras en los párpados.

Dacriocistitis y canaliculitis

La infección producida por obstrucción del conducto lagrimal inferior que compromete el saco lagrimal es la dacriocistitis. Cuando afecta al canaliculo, la llamamos canaliculitis. Esta infección puede producirse, directamente, por entrada de microorganismos, desde el exterior al conducto lagrimal (mecanismo más frecuente), o a través de la sangre (endógena).

Dacriocistitis: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, bacilos gram negativos, micobacterias.

Canaliculitis: Hongos (*Fusarium* spp.), *Actinomyces* spp. y microorganismos anaerobios.

Conjuntivitis

Es la más frecuente de las infecciones oculares. Puede ser de naturaleza no infecciosa (alérgica, química, traumática, etc.) o infecciosa (viral, bacteriana, parasitaria o micótica). La conjuntivitis viral suele ser autolimitada y, por lo tanto, no requerir del diagnóstico microbiológico. Los virus más comunes son los respiratorios y los del grupo Herpes. Las conjuntivitis bacterianas

pueden ser agudas o crónicas. Las primeras (menos de un mes de evolución) son las más frecuentes. Los agentes etiológicos involucrados son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae*. Sólo en algunas ocasiones se aíslan bacilos gram negativos. Las crónicas son comúnmente producidas por *Staphylococcus aureus*, bacilos gram negativos y *Actinomyces* spp. En el neonato predominan *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Para la realización de los estudios microbiológicos se efectúan hisopados. La toma de la muestra se efectúa con hisopo frotando exclusivamente la conjuntiva y colocándolo en un tubo con medio de transporte. Se debe conservar a temperatura ambiente el menor tiempo posible y, luego, enviar al laboratorio. Es importante recordar que para métodos moleculares (PCR), por ejemplo para detección de *Chlamydia*, se deben utilizar hisopos de dacrón y enviar la muestra en un tubo seco y estéril (Tabla 1).

Queratitis

Es una infección de las capas externas de la córnea. Muchas veces se asocia al uso de lentes de contacto. Las bacterias son los agentes etiológicos más frecuentes y, dentro de éstas, los cocos gram positivos. En menos del 1% de los casos podemos ver también hongos como *Fusarium* spp., generalmente después de un traumatismo, y parásitos, como *Acanthamoeba*.

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* o *Herpes simplex* pueden producir la perforación de la córnea y la pérdida del ojo en términos de horas.

En la mayoría de los casos se apela a un tratamiento antimicrobiano empírico. El estudio microbiológico está indicado cuando la úlcera es profunda, cuando hay signos de inflamación, en casos graves o en casos de falla de tratamiento.

Para la toma de muestra deben efectuarse raspados de la córnea con espátulas especiales (espátula de Kimura) o bisturí. En casos especiales se procede a la biopsia. Luego del raspado, directamente con la hoja de bisturí o con la espátula, se inoculan placas de agar sangre y agar chocolate, haciendo pequeñas estrías, lo cual facilita la diferenciación entre patógenos y contaminantes. Luego se siembra en caldo tioglicolato y en un tubo de agar Sabouraud. Si la siembra se demora, deben utilizarse medios de transporte líquidos (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares, procedimiento de toma de muestra y medios de transporte

Infección o sitio de toma de muestra	Tipo de muestra	Procedimiento	Medio de transporte
Conjuntivitis	Exudado conjuntival	Toma con hisopo de dacrón o similar	Amies y medios para virus o <i>Chlamydia</i>

Blefaritis	Exudado palpebral	Toma con hisopo de dacrón o similar	Amies
Queratitis	Raspado corneal	Raspado con espátula de Kimura, hoja de bisturí o aguja	Caldo de transporte. Amies
Biopsia de córnea	Trepanación no penetrante bajo microscopio		Solución fisiológica estéril o caldo de transporte
Lente de contacto	Raspado de la cara cóncava		Solución fisiológica estéril
Endoftalmitis	Humor vítreo	Aspirado con jeringa o lavado	Caldo de transporte
Vitrectomía	Lente intraocular	Extirpación quirúrgica	Solución fisiológica estéril
Dacriocistitis o canaliculitis	Exudado	Aspirado con jeringa	Medio de transporte para anaerobios

La positividad de los cultivos de córnea no es superior al 60-70% de los casos en que exista sospecha de queratitis infecciosa. Esto puede deberse a que el material obtenido suele ser insuficiente dado el escaso tamaño de las úlceras, a la demora en la toma de muestra o al tratamiento previo con antibióticos.

Se considera que un aislamiento de una muestra de córnea es significativo cuando se trata de un patógeno reconocido. En caso de tratarse de estafilococos coagulasa negativos, corinebacterias o estreptococos del grupo viridans, éstos deben aislarse en cultivo puro, haberse visto en el examen microscópico directo y haber desarrollado a partir de varios raspados.

Los líquidos conservantes o la superficie de las lentes de contacto pueden estar contaminados por microorganismos saprófitos, por lo cual hay escasa coincidencia entre el cultivo de los mismos y los microorganismos aislados de la úlcera corneal.

Endoftalmitis

La endoftalmitis es la inflamación de los fluidos y tejidos intraoculares. Se trata de una infección grave que, a pesar de ser tratada oportunamente, puede conducir a la pérdida de la visión. Se clasifican en endógenas o bacteriémicas, posquirúrgicas, y postraumáticas.

Los agentes etiológicos son variados y dependen del tipo de endoftalmitis (Cuadro 1).

Aquí el diagnóstico se realiza por punción vítrea (Tabla 1). Las muestras de aspirado de humor vítreo o lavados posvitrectomía se inoculan en agar chocolate agar sangre (aire con 5% de CO₂), agar sangre lacada con vitamina K (anaerobiosis) y en caldo tioglicolato.

Infección de la coroides o de la retina

En estas estructuras pueden impactar microorganismos provenientes de sitios remotos a partir de la sangre. Pueden ser complicaciones de sífilis (*Treponema pallidum*), tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) o enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*). También pueden ser producidas por virus o parásitos.

Cuadro 1. Agentes etiológicos de endoftalmitis según tipo.

Posquirúrgica temprana (menos de 6 meses después de la cirugía)
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulasa negativos <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Estreptococos del grupo viridans Bacilos gram negativos
Posquirúrgica tardía (más de 6 meses después de la cirugía)
<i>Propionibacterium acnés</i> <i>Staphylococcus</i> spp. coagulasa negativos <i>Corynebacterium</i> spp Micobacterias atípicas Hongos
Postrumática
<i>Bacillus cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> spp. coagulasa negativos Infecciones mixtas
Endógena, funguémica o bacteriémica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Hongos <i>S. aureus</i>

Bibliografía específica

American Academy of Ophthalmology. Summary benchmarks for preferred practice pattern guidelines. November 2008. Disponible en: URL: <http://one.aao.org>.

Dahlgren M, Lingappan A, Wilhelmus K. The clinical diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2007;143:940–944.

Jackson WB. Blepharitis: current strategies for diagnosis and management. *Can J Ophthalmol.* 2008;43:170–179.

- Kaye SB, Rao PG, Smith G, et al.** Simplifying collection of corneal specimens in cases of suspected bacterial keratitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:3192–3197.
- Kratz A, Levy J, Belfair N, et al.** Broth culture yield vs. traditional approach in the work-up of endophthalmitis. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:1022–1026.
- Mills DM, Bodman MG, Meyer DR, et al.** The microbiologic spectrum of dacryocystitis: a national study of acute versus chronic infection. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2007;23:302–306.
- Sharma S, Kunimoto DY, Gopinathan U, et al.** Evaluation of corneal scrapping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis. *Cornea*. 2002;21:643–647.
- Tarabishy AB, Hall GS, Procop GW, et al.** Bacterial culture isolates from hospitalized pediatric patients with conjunctivitis. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:678–680.

CAPÍTULO 12

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto genital

En este capítulo vamos a tratar principalmente las llamadas “infecciones de transmisión sexual” (ITS), término que se aplica a un grupo de enfermedades que en común tienen ese modo de transmisión. Desde el punto de vista de su prevención, son aquellas enfermedades infecciosas cuya transmisión sexual reviste una importancia epidemiológica. También consideraremos infecciones del tracto genital cuyo modo de transmisión sea otro o no esté claramente asociado a la transmisión sexual.

En principio, resulta necesario conocer la composición de la microbiota habitual urogenital. Ésta se encuentra conformada por cocos y bacilos gram positivos facultativos y anaerobios en la uretra del hombre y, principalmente, por lactobacilos en la vagina de la mujer.

Dentro de las infecciones del tracto genital, podemos considerar dos grupos: úlceras genitales y supuraciones genitales.

Úlceras genitales

Las enfermedades de este grupo se caracterizan por presentar, como síntomas primarios, la aparición de lesiones genitales. Las características morfológicas de estas lesiones y su evolución, pueden servir de orientación en el diagnóstico. También se tiene en cuenta el número (único o múltiple) de lesiones, su sensibilidad a la palpación (dolor), la base, el margen de la lesión, entre otros. Pueden aparecer manifestaciones dermatológicas extragenitales, por inoculación directa de patógenos, retransmisión sexual por prácticas urogenitales y bucales receptivas o por diseminación de las infecciones transmitidas sexualmente. Dentro de este grupo podemos incluir la sífilis, el chancro blando, el herpes genital y el granuloma inguinal.

Sífilis

Presenta tres estadios: primario, secundario, latente temprano, latente tardío y terciario.

Sífilis primaria

Se caracteriza por la aparición de un chancro duro en los bordes e indoloro, especialmente en los genitales. Esta lesión es rica en treponemas y allí es factible de realizar el examen directo en campo oscuro (Parte I, capítulo 3). No obstante, se suelen realizar pruebas serológicas treponémicas y no treponémicas.

El examen directo en campo oscuro consiste en la observación de las espiroquetas en un microscopio que tenga un condensador de campo oscuro, que permita la incidencia de la luz en forma lateral. De este modo, se podrán visualizar partículas de espesor muy delgado, como los treponemas. Las coloraciones habituales no permiten su observación justamente por tratarse de bacilos largos pero muy delgados.

Las pruebas serológicas no treponémicas son la VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), que es la más utilizada, y la RPR (reaginas plasmáticas rápidas).

En la VDRL se utiliza un antígeno inespecífico (cardiolipina-lecitina-colesterol) que puede aglutinar en casos de enfermedades del colágeno, lupus, entre otras.

Estas pruebas permiten reforzar la sospecha diagnóstica, si el examen directo es negativo o no se pudo efectuar (involución del chancro). Son pruebas de aglutinación, que pueden servir para controlar la evolución de la enfermedad, porque con un tratamiento efectivo, sus títulos disminuyen en el tiempo. Su sensibilidad en la sífilis primaria es de alrededor del 70%. En caso de resultados positivos, éstos deberán ser confirmados con pruebas treponémicas específicas como la FTA-Abs (absorción de anticuerpos treponémicos fluorescente) o la microhemaglutinación (MHA-TP). Los títulos de las pruebas treponémicas no disminuyen ni siquiera con el tratamiento, por lo que no pueden ser utilizadas para el diagnóstico en pacientes que ya hayan padecido de sífilis en el pasado ni para el seguimiento de los pacientes tratados.

Sífilis secundaria

El estadio secundario ocurre luego de la cicatrización del chancro y por diseminación hematógena del microorganismo (2 semanas a 6 meses). El paciente puede presentar fiebre, malestar general, anorexia y erupción generalizada con otras manifestaciones cutáneas (condiloma plano). Luego aparecen los períodos de latencia en los que la enfermedad sólo se reconoce por la reactividad de las pruebas serológicas. Hay algunas lesiones en piel y mucosas donde pueden observarse los treponemas por microscopía de campo oscuro. Las pruebas serológicas en este estadio son positivas.

Sífilis terciaria

Esta etapa se caracteriza por la destrucción de tejidos, probablemente por mecanismos de autoinmunidad: afectación del sistema nervioso central (neurosífilis), problemas cardiovasculares (arteritis), y lesiones granulomatosas en diversos órganos (gomas sífilíticas). No hay lesiones ricas en treponemas, por lo que no es factible el diagnóstico por microscopía.

Examen de laboratorio

Debe examinarse cualquier lesión genital ulcerada o hipertrófica ubicada en un área húmeda. Deben usarse guantes. Para el examen en campo oscuro (búsqueda de *Treponema pallidum*), se debe limpiar la zona con un hisopo o gasa. Si sangra, se debe limpiar nuevamente y esperar hasta que aparezca un líquido seroso. Con el borde no filoso de un bisturí se recogerá una gota de ese líquido y se depositará sobre un portaobjetos. La operación se repetirá una vez más. Ambas gotas se cubrirán con sendos cubreobjetos. Inmediatamente, se efectuará la observación microscópica por iluminación sobre campo oscuro para la búsqueda de espiroquetas móviles (ver Parte I. capítulo 3. El microscopio).

Hasta el momento no se ha podido cultivar *Treponema pallidum* en medios de cultivo artificiales. El conejo es el animal de experimentación más apropiado para el cultivo in vivo y la inoculación preferida es la intratesticular.

Coloración de tejidos lesionados

La coloración de Gram no es de utilidad en úlceras genitales por *Treponema pallidum*, ya que el microorganismo es extremadamente delgado y no se colorea con esta tinción. Se puede utilizar la impregnación argéntica (por ejemplo, Fontana-Tribondeau). En este caso se aumenta el espesor del microorganismo por la precipitación de la plata metálica. Son técnicas de difícil ejecución, poco reproducibles y de muy baja sensibilidad por lo que actualmente han sido reemplazadas por la observación en campo oscuro.

La coloración de Giemsa o Wright: es útil para la búsqueda de inclusiones características del granuloma inguinal (cuerpos de Donovan) pero no para la sífilis primaria.

Fuera de la sífilis, las lesiones papulares¹⁰ pueden ser aplastadas, raspadas y teñidas con distintos agentes. El calentamiento del material raspado, con 10% de KOH destruirá elementos escamosos y así pueden observarse dermatofitos, hongos levaduriformes o el ácaro o larva de la sarna.

¹⁰ Mácula: lesión plana no infiltrada con cambio de coloración en la piel. Pápula: lesión circunscripta elevada con capacidad resolutive.

Serodiagnóstico

Las pruebas serológicas pueden estar dirigidas a poner de manifiesto la presencia de dos tipos de antígenos: treponémicos (específicos) y no treponémicos (inespecíficos).

La VDRL es la más utilizada de las pruebas no treponémicas. Es una prueba de aglutinación realizada con el suero del paciente y un reactivo formado por antígenos inespecíficos (partículas de colesterol cubiertas con cardiolipina y lecitina). Si bien no es una prueba específica, es muy útil para el tamizaje (*screening*) poblacional porque, como ya se mencionó, detecta más del 70% de los casos de sífilis primaria, 99% de los casos de sífilis secundaria, sirve para el diagnóstico de neurosífilis si se realiza en LCR y permite efectuar el seguimiento de la evolución de la enfermedad en los casos confirmados y tratados, ya que sus títulos disminuyen en el tiempo si el tratamiento es efectivo.

Las pruebas treponémicas son la microhemaglutinación y la determinación de anticuerpos treponémicos fluorescentes con absorción de otros inespecíficos (FTA-Abs). La FTA-Abs se realiza en pacientes sospechados de padecer sífilis por haber sido positiva una reacción no treponémica previa. No debe efectuarse en aquellos que hayan tenido sífilis en el pasado porque esta reacción permanece positiva de por vida. Primeramente se absorben los anticuerpos no treponémicos que puedan estar presentes en el suero de un paciente con antígenos adecuados. Luego se cubren con ese suero absorbido los treponemas (desarrollados en conejos) fijados a un portaobjetos. Después se cubre con un reactivo compuesto por anticuerpos antihumanos conjugados con isotiocianato de fluoresceína y se observa con microscopio de fluorescencia.

El tratamiento de elección de la sífilis es la aplicación de penicilina benzatínica según pautas estandarizadas.

Supuraciones genitales

Este grupo de ETS tiene en general como síntoma inicial la supuración genital dando uretritis en el varón y vaginitis y cervicitis en la mujer. De acuerdo a las costumbres sexuales del paciente o a la etapa en que se encuentra la enfermedad, pueden aparecer órganos y tejidos extragenitales inflamados y con presencia de supuración.

A este tipo de enfermedades se las agrupa como (1) **Infecciones genitales gonocócicas**: producidas por *Neisseria gonorrhoeae* y (2) **Infecciones genitales no gonocócicas**: producidas por otros agentes (por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*).

También están las **infecciones genitales posgonocócicas**, producidas por otros agentes que persistieron luego de un tratamiento específico para *Neisseria gonorrhoeae*.

Definiciones

Uretritis: es la inflamación aguda o crónica de la uretra. La uretritis puede ser anterior o posterior según su ubicación en la uretra.

Cervicitis: Inflamación del cuello de útero.

Vaginitis: Inflamación de la vagina.

Sexo femenino

Flujo vaginal

Debe tenerse en cuenta la edad, los hábitos sexuales y la forma de presentación de la infección.

Toma de muestra

1. Niñas prepúberes: Tomar la muestra con pipeta de Papanicolaou pediátrica. Volcar el material en tubo con solución fisiológica. Procesar de inmediato.

2. Mujeres sexualmente activas: Tomar muestras de fondo de saco vaginal y endocérvix por separado. La muestra de fondo de saco se toma con hisopo o pipeta de Papanicolaou y se introduce en un tubo estéril con solución fisiológica. La muestra de endocérvix se toma con hisopo estéril de algodón pretratado o de alginato de calcio y se colocará en un tubo con medio de transporte (Stuart, Cary Blair, Amies). Conservar a temperatura ambiente el menor tiempo posible. Para *Chlamydia*, se deben utilizar hisopos de dacrón y enviar en tubos secos y estériles.

Procesamiento

1. Niñas prepúberes. Se debe realizar una coloración de Gram del material obtenido y una observación en fresco, del mismo modo que se realiza en mujeres (ver más adelante). Además de los patógenos genitales (de importancia en casos de abuso) se deberá utilizar una placa de agar sangre para búsqueda de estreptococos beta-hemolíticos y neumococos, una de agar chocolate para el aislamiento de *Haemophilus* y meningococos y una de CLDE porque *Shigella* es un agente reconocido de vulvovaginitis en niñas.

2. Mujeres sexualmente activas. En el examen de una secreción vaginal debe observarse el número relativo de células epiteliales y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

Tanto en la secreción vaginal normal como en la secreción endocervical normal o fisiológica, se encuentran PMN. De este modo, en mujeres sanas puede encontrarse un pequeño número de estas células. La observación de más de un PMN por célula epitelial debe hacer sospechar de una inflamación cervical o vaginal. No obstante, el hallazgo de pocos PMN no excluye la infección vaginal. A menudo la candidiasis vaginal produce secreción que contiene pocos PMN. *Candida* spp (generalmente *C. albicans*) es un hongo levaduriforme que puede verse en la coloración de Gram con o sin pseudomicelios y cultivarse en medios para hongos (agar Sabouraud).

Trichomonas vaginalis, un parásito unicelular flagelado puede observarse fácilmente en fresco por su movilidad. Para esto es necesario realizar una toma de muestra con hisopo, colocarla en solución

fisiológica y observar al microscopio lo más rápidamente posible. También pueden cultivarse en medios especiales. El cultivo es especialmente útil en exudados uretrales masculinos, ya que las tricomonas suelen ser inmóviles. Difícilmente se observan en la coloración de Gram. Se prefiere la tinción de Giemsa, pero pueden confundirse con leucocitos u otras células.

Otra alteración de la microbiota vaginal que ocurre en mujeres que no están infectadas con *Trichomonas vaginalis* ni *Candida* spp., que presentan PMN y que poseen signos y síntomas vulvovaginales es la “vaginitis inespecífica”.

La **vaginosis bacteriana** es una alteración en la secreción vaginal sin signos inflamatorios destacables. No hay signos inflamatorios pero sí una secreción vaginal que difiere de la fisiológica normal, generalmente grisácea, maloliente (causa de consulta), fluida y con presencia de burbujas. Se observan escasos PMN. El examen microscópico revela, por lo general, predominio de microbiota cocobacilar (*Gardnerella vaginalis*). Hay evidencias experimentales respecto a que se trata de una infección sinérgica, que implica no sólo *G. vaginalis*, sino también ciertas bacterias anaeróbicas (*Mobiluncus*, micoplasmas, *Bacteroides*, cocos anaerobios, entre otras.), conocidas como complejo GAMm.

El diagnóstico se establece en base a dos criterios: de Nugent y Amsel.

Criterios de Nugent: se estima la proporción relativa de los tipos bacterianos de 0 a 10 con la coloración de Gram.

Grado 1 (normal): Predominio de *Lactobacillus*

Grado 2 (intermedio): Flora mixta con presencia de *Lactobacillus*

Grado 3 (vaginosis bacteriana): Predominio de *Gardnerella*, *Mobiluncus* y *Bacteroides*, con muy pocos o ningún lactobacilo.

Criterios de Amsel:

- 1) Flujo vaginal blanco o blanco-grisáceo, homogéneo y fluido.
- 2) pH > 4,5
- 3) Con el agregado de KOH al 10%, olor a pescado en mal estado.
- 4) Presencia de *clue cells*: Estas son células epiteliales planas tapizadas de cocobacilos gram negativos.

Cuando están presentes tres de estas características, puede establecerse el diagnóstico de **vaginosis bacteriana**



Figura 1. Células clave (*clue cells*), típicas de la vaginosis bacteriana

Hisopado endocervical

El sitio primario de la gonorrea urogenital femenina es el endocérvix. La infección puede acompañarse de una descarga vaginal purulenta, irregularidad menstrual y disuria. Sin embargo, muchas mujeres con gonorrea sin complicaciones, siguen siendo asintomáticas o no presentan síntomas lo suficientemente severos como para consultar a un médico.

Insertar el espéculo y limpiar el mucus cervical con una bolita de algodón. Se toca con cuidado el conducto cervical, moviendo el hisopo de lado a lado. No usar desinfectantes antes de tomar la muestra y evitar la contaminación con microbiota vaginal.

Se efectúa un examen en fresco y un examen directo de la muestra por coloración de Gram

La muestra se siembra en agar chocolate y agar Thayer Martin para la búsqueda de gonococos. *N. gonorrhoeae* es habitualmente resistente a la concentración de vancomicina que contiene el agar Thayer Martin, pero existe aproximadamente un 5% de cepas sensibles. Por ello se siembra también una placa de agar chocolate. **Este microorganismo no crece en agar sangre.**

Exudado uretral femenino

Se cultiva la primera porción de orina de la mañana. La muestra se siembra en agar chocolate y agar Thayer Martin. Puede aumentarse la recuperación de gonococos centrifugando a 2.000 rpm durante 10 minutos.

Hisopado anorrectal

Se efectúa en todos los pacientes con infección gonocócica diseminada, homosexuales masculinos, mujeres con síntomas urogenitales y mujeres asintomáticas probablemente infectadas (contacto). Puede aislarse *Neisseria gonorrhoeae* a partir de este sitio mientras que a veces en la muestra tomada de endocérvix puede dar resultados negativos.

Tomar la muestra insertando un hisopo 4-5 cm en el conducto anal. Moverlo de lado a lado para abarcar las criptas. Descartar el hisopo si se observa contaminación fecal. La muestra se siembra en agar chocolate y agar Thayer Martin, para la búsqueda de gonococos.

Hisopado faríngeo

En este caso sólo se busca *N. gonorrhoeae*. Generalmente se trata de pacientes asintomáticos.

Se pasa el hisopo por la faringe posterior y la región de las criptas amigdalinas. La muestra se siembra en agar chocolate y agar Thayer Martin.

Hisopado conjuntival

En recién nacidos con conjuntivitis se toma muestra de hisopado y se realiza coloración de Gram y el cultivo en agar chocolate y agar Thayer Martin.

Secreción de la glándula de Bartholino

Recoger parte del pus drenado en hisopos o aspirar material de abscesos cerrados con jeringa y aguja. (gonococos y anaerobios). El contenido de la jeringa se vuelca en un frasco de transporte anaeróbico (T.A.B., Laboratorios Britania, Buenos Aires). La muestra se siembra en agar chocolate y agar Thayer Martin.

Sangre

Se utiliza en todo paciente del que se sospeche infección gonocócica diseminada. Se inocula directamente en un frasco de hemocultivo. Deberá tenerse en cuenta que el polianetol sulfonato de sodio que se utiliza habitualmente como anticoagulante, es tóxico para algunas cepas de *N. gonorrhoeae*.

Líquido articular

En pacientes con infección gonocócica diseminada, se debe aspirar material de las articulaciones que se sospechen infectadas. Se debe transportar en recipientes estériles y realizar coloración de Gram y cultivo en agar chocolate.

Tabla 1. Sitios de toma de muestra

Paciente	Sitio primario	Sitio secundario
Mujer	Endocérvix	Recto, uretra, faringe
Hombre heterosexual	Uretra	
Hombre homosexual	Uretra, recto, faringe	
IGD* mujer	Sangre, endocérvix, recto	Faringe, lesiones cutáneas, líquido articular
IGD* hombre	Sangre, uretra	Faringe, lesiones cutáneas, líquido articular, recto
Recién nacidos (conjuntivitis)	Conjuntiva	

* Infección gonocócica diseminada.

Sexo masculino

Uretritis gonocócica

La gonorrea es una de las infecciones bacterianas más comúnmente observada. Se transmite por contacto directo y estrecho entre individuos, especialmente por contacto sexual.

En el hombre, la manifestación común de la infección es la uretritis aguda, caracterizada por la aparición abrupta de disuria y una descarga uretral purulenta.

Toma de muestra

Como muestras válidas para el estudio de la uretritis en el varón, se pueden mencionar el exudado matinal, el primer chorro de la primera micción matinal o el primer chorro, con tres horas de retención mínima.

Se deben tomar muestras de secreción uretral de hombres por lo menos dos o tres horas después de haber orinado. La descarga purulenta puede recogerse directamente en hisopo. Si no hay

descarga, se obtiene raspando suavemente la mucosa de la uretra anterior con ansa estéril. Alternativamente, se puede insertar un hisopo 2 cm dentro de la uretra y rotarlo suavemente.

Si se utilizan hisopos, éstos deben ser de alginato de calcio o de dacrón. El hisopo de algodón puede contener ácidos grasos no saturados que inhiben el crecimiento del gonococo. Por eso, estos hisopos pueden utilizarse sólo si la siembra es inmediata, o si, previamente se tratan, hirviéndolos primero en solución alcalina de fosfato y luego pasándolos por una suspensión de carbón activado al 1%.

Transporte al laboratorio

Los gonococos son muy susceptibles a condiciones adversas de sequedad y temperatura, por lo tanto es importante utilizar medios de transporte hasta procesar la muestra. Estos medios pueden ser: Stuart o Amies; en ellos sobreviven entre 6 y 12 horas si no son expuestos a temperaturas extremas. Luego de 24 horas la viabilidad es mínima.

Consideraciones generales

Si la secreción no es purulenta, desde el laboratorio se puede decir que hay reacción inflamatoria cuando en el examen de un frotis de secreción uretral se observan:

- 1) Más de cuatro leucocitos (PMN) por campo, en la coloración de Gram (1000X).
- 2) Más de 15 leucocitos por campo, en el examen en fresco del sedimento de una primera porción de orina (400X), después de ser centrifugada con una retención de, al menos, 3 horas.

Procesamiento de la muestra

Si se trata de material purulento (uretral masculino), se procede de la siguiente manera: Se toman dos hisopados, con uno se realizan dos extendidos. Uno se tiñe con la coloración de Gram (en caso de gonorrea, se ven diplococos gram negativos en forma de granos de café enfrentados intra y extracelulares) y el otro, con colorante de Giemsa (para ver *Trichomonas*) o azul de metileno (para ver mejor los diplococos intracelulares). Luego, el contenido del hisopo se suspende en solución fisiológica, para la observación en fresco de parásitos (*Trichomonas*) u hongos levaduriformes. El otro hisopo se coloca en medio de transporte (Amies, con carbón activado o similar) y se utiliza para la siembra en agar Thayer Martin (medio selectivo para gonococo – ver Apéndice II) y agar chocolate. (Fig. 2)

Ambos medios se incuban durante 72 h en atmósfera de 5% de CO₂. Esta siembra en agar chocolate se realiza porque, como se mencionó previamente, aproximadamente un 5 % de los gonococos son inhibidos por la vancomicina del agar Thayer Martin.

En el varón, la observación de diplococos gram negativos con la morfología y la disposición típicas (Fig 3), ya es suficiente como para comunicar al médico que el estudio es positivo para *Neisseria gonorrhoeae*. Esto es así porque la microbiota habitual de la uretra del hombre es muy escasa y en ella no aparecen cocos gram negativos. En la mujer, se debe esperar el resultado del cultivo, porque la presencia de diplococos gram negativos diferentes de *N. gonorrhoeae*

puede darse en virtud de que puede estar colonizada con *Veillonella* (cocos gram negativos anaerobios) u otros cocos o cocobacilos gram negativos.

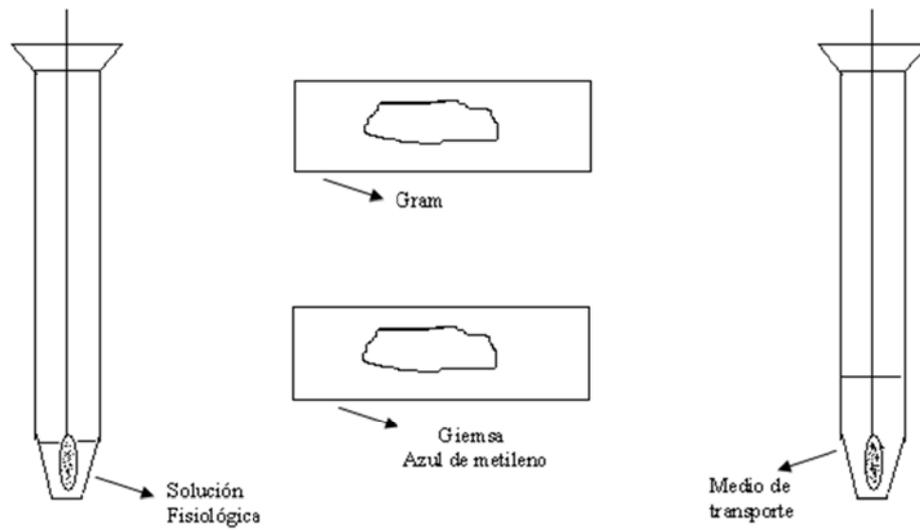


Fig. 2. Procedimiento inicial en la siembra de un exudado uretral masculino

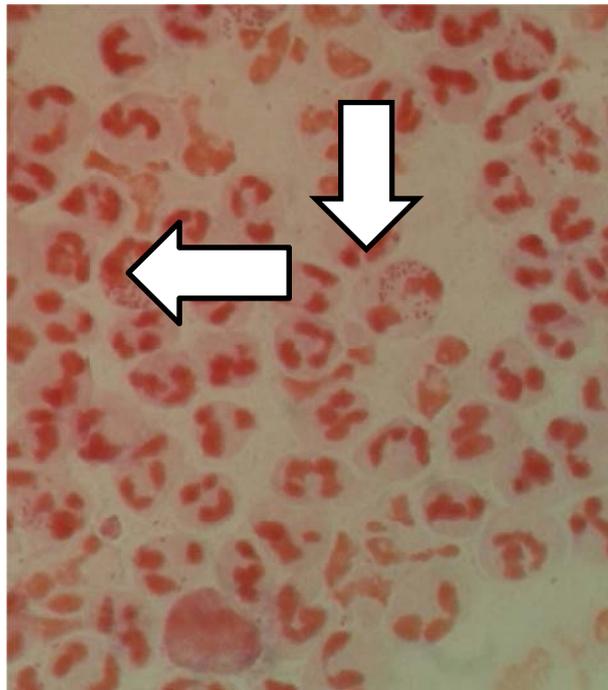


Fig. 3. Coloración de Gram de un exudado uretral de un paciente del sexo masculino con gonorrea. Nótese la presencia de diplococos gram negativos intra y extracelulares

Urethritis no gonocócica

La urethritis no gonocócica puede estar dada por levaduras. En este caso, generalmente está afectado el glande y/o el surco balanoprepucial. También pueden encontrarse *Trichomonas* y, más frecuentemente, *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis*.

Las levaduras se observan en el examen en fresco y en las coloraciones de Gram o Giemsa.

Las *Trichomonas* por lo general dan infecciones asintomáticas en el varón. Dichos parásitos, en este entorno, pierden movilidad y es difícil diferenciarlos de leucocitos, en un examen en fresco o en una tinción de Giemsa. Es por eso que para diagnosticar la tricomoniasis masculina es esencial el cultivo.

Ureaplasma urealyticum se puede cultivar en medio PPLO con agregado de urea, pero hay medios comerciales *ad hoc* y también métodos moleculares (PCR) (ver Parte III, Capítulo 6).

Chlamydia trachomatis puede diagnosticarse por inmunofluorescencia directa, pero son más sensibles y específicos los métodos moleculares (PCR). Este microorganismo no es capaz de crecer en medios artificiales, por lo que para su aislamiento se requiere de un cultivo celular (no se efectúa de rutina, ver parte III, Capítulo 6).

CAPÍTULO 13

Infecciones intraabdominales

Las infecciones intraabdominales son bastante frecuentes y se originan principalmente en la perforación intestinal o en el desarrollo de un proceso inflamatorio. Pueden no ser complicadas cuando la infección es limitada o bien complicadas, si la infección es generalizada (peritonitis) o localizada, en forma de abscesos.

Peritonitis

Las peritonitis pueden ser primarias, secundarias o terciarias.

Peritonitis primarias

Son aquellas que aparecen sin mediar ningún procedimiento o accidente que las justifiquen, ni ningún foco infeccioso intraabdominal previo. Son principalmente monomicrobianas.

Entre ellas se destaca la **peritonitis bacteriana espontánea**. Es frecuente en adultos con cirrosis y en niños con síndrome nefrótico o hepatopatía crónica. Más raramente, puede encontrarse en niños sanos con algún tipo de infección en vías aéreas o genitourinarias. Se presenta con fiebre, dolor abdominal y algunos otros síntomas inespecíficos.

El diagnóstico microbiológico se realiza a través del estudio microscópico y el cultivo del líquido ascítico. El líquido ascítico es un líquido seroso que se forma en el espacio existente entre el revestimiento del abdomen y los órganos abdominales (la cavidad peritoneal). Un recuento mayor de 250 polimorfonucleares por mm^3 de líquido indica, presuntivamente, la presencia de peritonitis bacteriana espontánea (Tabla 1). Se recomienda también efectuar hemocultivos, porque son positivos en más de la mitad de los casos. Los métodos moleculares son más sensibles que el cultivo.

Entre las peritonitis primarias también podemos contar la **peritonitis tuberculosa o granulomatosa**. Dentro de las complicaciones de la tuberculosis, ésta es poco frecuente y se da,

principalmente, en pacientes que presentan condiciones predisponentes tales, como el alcoholismo, la infección por VIH, la diabetes, entre otras.

Obviamente, se trata de una tuberculosis diseminada por vía hematológica. Otras micobacterias diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* también pueden producirla.

El diagnóstico de las micobacterias se realiza por los procedimientos habituales (parte IV capítulo 3, parte III, capítulo 5). Se debe recoger una buena cantidad de líquido ascítico o, mejor aún, realizar una biopsia peritoneal. La sensibilidad del examen directo es baja y la del cultivo puede superar el 90%. Los métodos moleculares son menos sensibles que el cultivo.

La **diálisis peritoneal**, destinada al tratamiento de la insuficiencia renal, puede ser también la puerta de entrada de microorganismos al peritoneo. Esto ocurre a través del catéter que se inserta en la pared abdominal para realizar este procedimiento. La peritonitis es la principal complicación de la diálisis peritoneal y, en algunos casos, puede llevar al paciente a la muerte o al fracaso de la diálisis.

Los microorganismos más frecuentes son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden producirla los estreptococos, los bacilos gram positivos difteromorfos, los estafilococos coagulasa negativos y los hongos.

Clínicamente, se manifiestan por aparición de pus en la inserción del catéter, eritema y edema. Se caracteriza por la turbiedad del líquido de diálisis debida a la presencia de leucocitos. La presencia de más de 100 leucocitos por ml y el predominio de polimorfonucleares, indican la existencia de una reacción inflamatoria que la mayoría de las veces corresponde a una peritonitis bacteriana.

El diagnóstico microbiológico puede realizarse recogiendo el pus si hay supuración en la inserción del catéter, el cultivo del catéter si es que se retira y el cultivo de 50 ml de líquido de diálisis en frascos con 50 ml de caldo en doble concentración. También pueden cultivarse en frascos de hemocultivo en sistemas automatizados (Tabla 1).

Peritonitis secundarias

Se caracterizan por fiebre, dolor abdominal generalizado. Pueden conducir al desarrollo de un *shock séptico*.

Se producen por contaminación microbiana a partir de una perforación del esófago, estómago o intestino, en forma espontánea o por trauma o cirugía. También pueden producirse por complicación de un proceso inflamatorio intraabdominal.

La contaminación microbiana del peritoneo no siempre conduce a una peritonitis. Algunas veces los mecanismos de defensa pueden controlar la proliferación bacteriana, otras veces también pueden determinar la formación de abscesos.

Las peritonitis secundarias son polimicrobianas. Las bacterias anaerobias son las que predominan en las perforaciones intestinales, tanto en las adquiridas en la comunidad como en el hospital (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Prevotella*, entre otras). Cuando el sitio perforado es el esófago o el

estómago, podemos encontrar con más frecuencia estreptococos, hongos levaduriformes y también gram positivos anaerobios. En las nosocomiales encontramos gérmenes comunes multirresistentes.

El diagnóstico se basa en las características clínicas del paciente. El estudio microbiológico sirve para reconocer la presencia de determinados agentes causales (por ejemplo, hongos y bacterias multirresistentes). Los hemocultivos deben realizarse en pacientes graves, a pesar que su positividad no supera el 25%.

Peritonitis terciarias

Se llaman peritonitis terciarias a las que ocurren por el fracaso del tratamiento de las primarias o secundarias. Las causas del fracaso pueden ser varias: problemas inmunitarios del huésped (inmunodeprimidos), desnutrición, enfermedades subyacentes o resistencia de los microorganismos al tratamiento.

El cuadro clínico es similar al de las anteriores, aunque a veces puede estar enmascarado por la medicación recibida previamente.

Los microorganismos más frecuentes son los bacilos gram negativos y enterococos multirresistentes, estafilococos y *Candida*.

Abscesos

Los abscesos son colecciones purulentas que se acumulan en cavidades rodeadas de paredes fibrosas que no existían previamente. Se producen, al igual que las peritonitis, por perforaciones o por procesos inflamatorios parcialmente controlados por los mecanismos defensivos (apendicitis, pancreatitis, colecistitis). Los hay intraperitoneales, hepáticos, pancreáticos, esplénicos, suprarrenales, retroperitoneales y abscesos del psoas.

El diagnóstico microbiológico de los abscesos se realiza por punción percutánea guiada por ecografía o tomografía computada. El material se introduce en un sistema para transporte anaeróbico. Parte de él se utiliza para la realización de la coloración de Gram y cultivo para gérmenes comunes y anaerobios y otra parte puede ser utilizada para inocular frascos de hemocultivo.

En el caso de los abscesos hepáticos y los pancreáticos, se pueden realizar hemocultivos en paralelo, ya que su positividad no es baja (alrededor de un 50%).

Abscesos intraperitoneales

Dentro de los abscesos intraperitoneales podemos reconocer a los subfrénicos (inmediatamente por debajo del diafragma), del epiplón menor (secundarios a pancreatitis o perforación

gastroduodenal), subhepáticos (posquirúrgicos), los abscesos entre asas (generalmente por perforación intestinal) y los abscesos pélvicos (complicación de diverticulitis, enfermedad inflamatoria pélvica o peritonitis apendicular).

La etiología es polimicrobiana y se estableció la acción sinérgica entre enterobacterias, enterococos y anaerobios.

Las manifestaciones clínicas son las mismas que las descritas para las peritonitis. Para su diagnóstico, es necesario realizar estudios radiológicos, ecografías, tomografías computadas o resonancia magnética nuclear.

Para el diagnóstico microbiológico, la muestra se obtiene por punción o cirugía. Aquí es importante el uso de sistemas de transporte anaeróbico y la siembra en el menor tiempo posible.

Los abscesos hepáticos se producen por la invasión microbiana posterior a un trauma o cirugía, a través de la vía biliar, a través de la sangre o por presencia de un foco cercano (por contigüidad). Pueden ser mono o polimicrobianos. Entre los microorganismos más importantes podemos citar a los estreptococos viridans del grupo anginosus, a las enterobacterias, estafilococos y hongos levaduriformes. Entre los anaerobios son frecuentes *Bacteroides* del grupo *B. fragilis*, *Fusobacterium* spp y *Clostridium* spp.

Tabla 1. Diagnóstico microbiológico de las infecciones intraabdominales

Muestra	Toma de la muestra	Procedimiento	Microorganismos esperables
Líquido peritoneal	Punción o cirugía	Gram Ziehl Neelsen Cultivo	Gérmenes comunes ^a Anaerobios Micobacterias Hongos
Bilis	Cirugía	Gram Cultivo	Gérmenes comunes Anaerobios Hongos
Líquido de diálisis	Punción de la bolsa de diálisis	Cultivo (más de 50 ml de líquido)	Gérmenes comunes Hongos
Catéter de diálisis	Extracción quirúrgica	Siembra en caldo	Gérmenes comunes Hongos
Exudados purulentos	Aspiración con jeringa	Gram Cultivo	Gérmenes comunes Anaerobios Hongos
Biopsias de tejidos	Cirugía o punción percutánea	Homogeneizado Gram Cultivo	Gérmenes comunes Anaerobios Micobacterias Hongos
Abscesos	Punción o cirugía	Gram Cultivo	Gérmenes comunes Anaerobios Hongos

^aGérmenes comunes: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp.

Los abscesos pancreáticos son complicaciones de la pancreatitis aguda. Se pueden dar en forma precoz (primera o segunda semana) o tardía (después de la cuarta semana). Su mortalidad es elevada (20–50%). La pancreatitis puede producirse por invasión microbiana a partir del tracto digestivo, las vías biliares, trauma o cirugía. Las infecciones pueden ser mono o polimicrobianas. Frecuentemente son producidas por gérmenes comunes, aunque también pueden aparecer anaerobios y hongos.

Los abscesos esplénicos (del bazo) son menos frecuentes pero tienen una mortalidad del 20%. Se producen por invasión de microorganismos procedentes de la sangre (bacteriemia) y los agentes etiológicos más frecuentes son los estreptococos, los estafilococos y las enterobacterias. Los anaerobios aparecen con menor frecuencia que en otros abscesos. Los hongos y las micobacterias pueden encontrarse en individuos inmunocomprometidos.

Abscesos retroperitoneales

Pueden ser perirrenales o pararrenales. Los perirrenales se forman a partir de infecciones urinarias previas que primero producen abscesos renales. Como factores predisponentes, podemos contar la litiasis, las malformaciones y la diabetes. Frecuentemente son monomicrobianos y producidos por bacilos gram negativos (patógenos urinarios). También pueden originarse por vía hematológica y el microorganismo más frecuente en este caso es *Staphylococcus aureus*.

Los pararrenales se originan en procesos infecciosos intraabdominales y, por lo tanto, en general, son polimicrobianos.

Abscesos del psoas

El psoas es un músculo que se inserta en las vértebras (D12 hasta L5), así como en la base de las apófisis costiformes correspondientes, y desciende hacia la fosa ilíaca del coxal, donde se une con la porción ilíaca.

Puede haber abscesos primarios, de origen hematológico. En este caso, el agente más frecuente es *Staphylococcus aureus*. Suele afectar a individuos jóvenes, inmunodeprimidos o drogadictos endovenosos.

Los secundarios se dan por contigüidad en procesos digestivos (enfermedad de Crohn), infecciones urinarias, osteomielitis vertebral, entre otros. Pueden ser monomicrobianos (*S. aureus*, micobacterias) o polimicrobianos (microbiota intestinal aerobia y anaerobia).

Bibliografía específica

García Sánchez JE, García García MI, García Garrote F, et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones intraabdominales. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2013; 31:230-239.

Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 133-164

PARTE V

Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

CAPÍTULO 1

Introducción

Objetivo

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos históricamente han sido realizadas de dos maneras: *in vitro* e *in vivo*. Estas últimas, a su vez, pueden realizarse en humanos o en animales.

Las pruebas de sensibilidad, en humanos, en otros tiempos se realizaban por autoinoculación o por inoculación a terceros, muchas veces de un modo discrecional y otras de un modo compasivo, como última alternativa para enfermos terminales. Actualmente existe una regulación de toda experimentación, tanto en humanos como en animales (menos avanzada). En el hombre se aplica el protocolo de Helsinki, que da cuenta de varias fases de experimentación y de pautas éticas que tienen que ver, como mínimo, con el consentimiento informado por parte del sujeto. Esta experimentación en humanos se da en una etapa posterior al estudio en animales, en el que necesariamente debió demostrarse un beneficio terapéutico sin efectos colaterales indeseables que hagan que la droga sea considerada no apta para el uso clínico. Hoy en día, estos estudios experimentales en animales y humanos no se realizan en forma rutinaria y se emplean en centros de investigación apropiados, especialmente para drogas que todavía no han salido al mercado.

En la rutina del laboratorio de Microbiología Clínica se realizan, exclusivamente, pruebas de sensibilidad *in vitro*. Para su estandarización, se emplean recomendaciones de entidades internacionales y nacionales que sirven para homogeneizar los procedimientos y las interpretaciones.

La Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas es quien ha normalizado la realización de estas pruebas en nuestro país, tomando como referencia las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute de los EE.UU. (CLSI) y del EUCAST europeo. Estas recomendaciones se renuevan anualmente, según la dinámica de los cambios observados en la epidemiología y según los aportes de las investigaciones que se van realizando en el campo de los antibióticos.

En principio, las pruebas *in vitro* tratan de predecir el efecto de un tratamiento *in vivo*, pero utilizando sólo dos de los tres elementos en juego: el antibiótico y la bacteria, puestos en un medio que dista mucho de ser el que naturalmente se da en una infección (Fig. 1).



Figura 1. Interacción entre los tres elementos puestos en juego en un caso de infección bacteriana

En la Figura 1 queda claramente ilustrado que lo determinado como *in vitro* corresponde a parámetros de sensibilidad o resistencia a la droga, que no predicen la evolución del paciente. Sobre ésta, influyen muchos otros factores que no están contemplados en las pruebas de sensibilidad *in vitro*: distribución del antibiótico en los diferentes tejidos o humores, interacción con proteínas (incluyendo inmunoglobulinas) y otras sustancias presentes en el sitio de acción, variación de las concentraciones del antibiótico en el tiempo, enfermedades subyacentes.

Los parámetros indicados por el CLSI, EUCAST y la Subcomisión de Antimicrobianos son: sensible, resistente e intermedio.

Se dice que una bacteria es sensible a un determinado antibiótico cuando se considera que las pruebas *in vitro* dan señales que una infección podría ser tratada de forma efectiva con las dosis habitualmente recomendadas para esa localización.

La categoría “intermedio” se aplica a antibióticos que en dosis habituales pueden ser inefectivos, pero que al aumentarlas pueden lograr el éxito terapéutico. Asimismo, se aplica a antibióticos que puedan concentrarse más en el tejido infectado que en la sangre, que es el tejido comúnmente elegido para poner los puntos de corte. También se emplea para poder contar con una zona de puntos indeterminados que separe la resistencia de la sensibilidad, en función de los errores metodológicos que presenta todo ensayo al respecto.

Se dice que una bacteria es resistente cuando no es inhibida por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas con las dosis habituales del antibiótico. También se considera resistente a la bacteria que presente algún mecanismo de reacción que haya demostrado generar falla terapéutica.

En el año 2014, CLSI modificó los puntos de corte para el caso especial de cefepima e incorporó una nueva categoría para la interpretación de las pruebas de sensibilidad: SDD (Sensibilidad Dosis Dependiente).

Esta categoría determina que la sensibilidad de un aislamiento es dependiente del régimen de dosificación que se utilice. El criterio de interpretación Sensible, se basa en una dosis de cefepima de al menos 1g/12h. El criterio de interpretación Sensibilidad Dosis Dependiente se basa en regímenes

de dosificación que resulten en una mayor concentración del antibiótico, que determina el mantenimiento de concentraciones por encima de la CIM por tiempos más prolongados. Este objetivo se puede lograr, ya sea aumentando la dosis, aumentando la frecuencia de la dosis, o ambos, hasta alcanzar los límites máximos de dosificación aprobados (2g/8h). De esta manera, infecciones por cepas que anteriormente hubiesen sido categorizadas como intermedias o no sensibles, pueden ahora tratarse con dosis adecuadas de cefepima.

Tabla 1. Categorías para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a cefepima

Metodología	Sensible*	SDD**	Resistente
CIM	≤2 µg/ml	4-8 µg/ml	≥16 µg/ml
Difusión	≥25mm	19-24mm	≤18mm

Bibliografía específica

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed., M07-A10, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 12th ed, M02-A12, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; informational supplement, M100-S25, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9a ed. Editorial Panamericana, 2007.

CAPÍTULO 2

Métodos de dilución en medio líquido

Pruebas de sensibilidad por macrodilución en medio líquido

Medios de cultivo

Para bacterias no exigentes de crecimiento rápido

Se utiliza el caldo Mueller Hinton (MH), con o sin el agregado de cationes bivalentes ($\text{Ca}^{++} = 20\text{-}25 \text{ mg/l}$; $\text{Mg}^{++} = 10 - 12,5 \text{ mg/l}$). El medio se prepara en botellas o frascos de Erlenmeyer, en cantidades medidas (80 ml). De este modo, el mismo medio se puede utilizar como base para efectuar el agregado de suplementos necesarios en la realización de pruebas con microorganismos más exigentes.

La solución de cationes se prepara del siguiente modo:

Cloruro de calcio = Pesar 0,37g de cloruro de calcio dihidratado. Disolver en 10 ml de agua destilada y filtrar con ultrafiltros de $0,22\mu\text{m}$.

Sulfato de magnesio = Pesar 1g de sulfato de magnesio heptahidratado. Disolver en 10 ml de agua destilada y filtrar con ultrafiltros de $0,22 \mu\text{m}$. Agregar 0,01 ml de cada una de las soluciones a 100 ml de caldo para aumentar la concentración final en 1 mg/l.

Hay marcas comerciales que tienen las cantidades conocidas de estas sales. Por ejemplo, el caldo MH Difco tiene 4,84 mg/l de calcio y 4,84 mg/l de magnesio. Por ello, deberán agregarse 0,18 ml de solución de cloruro de calcio y 0,07 ml de la solución de sulfato de magnesio.

El agregado de cationes divalentes es esencial para la realización de pruebas de sensibilidad por dilución con aminoglucósidos, en especial cuando se los ensaya frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Para bacterias exigentes

Haemophilus spp.

Se utiliza el medio HTM, cuya preparación es la siguiente:

Caldo Mueller Hinton800 ml

Extracto de levadura4g
Hematina bovina12mg en 1ml de amoníaco + 9ml de agua
Calentar en baño maría durante una hora
Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
Agregar en forma estéril 10 ml de una solución de NAD (1,5 mg/ml), esterilizada, por filtración (filtros de 0,22 µm).

Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus spp.*, *Neisseria meningitidis*

Se utiliza caldo Mueller Hinton adicionado de 2 a 5% vol/vol de sangre equina lisada por congelamiento y descongelamiento.

Preparación del inóculo

El inóculo bacteriano puede prepararse según dos métodos:

a. *Método clásico* (optativo para bacterias de crecimiento rápido):

A partir de un desarrollo en medio sólido, se prepara una suspensión en caldo Mueller Hinton con 5 colonias de igual aspecto. Se deja incubar entre 3 y 5 horas (hasta turbiedad visible) a 35 °C y se ajusta con el patrón N° 0,5 de la escala de McFarland que equivale a $1,5 \times 10^8$ ufc/ml.

b. *Método alternativo* (optativo para bacterias de crecimiento rápido, obligatorio para bacterias exigentes y *Staphylococcus*):

A partir de un desarrollo en medio sólido de no más de 24 horas, se prepara una suspensión con un número discreto de colonias, de modo tal que su turbiedad se equipare con la del patrón N°0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/ml). El medio a utilizar también debe ser caldo MH. El inóculo así preparado no debe mantenerse más de 15 minutos cuando se trabaja con *H. influenzae* o *S. pneumoniae*. Para otros microorganismos se puede dejar a temperatura ambiente hasta un máximo de tres horas.

Dilución del inóculo

El inóculo bacteriano a colocar en los tubos debe ser muy inferior en recuento de colonias al inóculo preparado inicialmente (0,5 de McFarland). La concentración final deseada es de 5×10^5 ufc/ml. Para ello se realiza una dilución 1/200 del inóculo original (0,05 ml en 10 ml de medio de cultivo). Para controlar que la concentración del inóculo haya sido la prevista, se efectúan otras dos diluciones, una 1/100 (0,05 ml en 5 ml de solución fisiológica) y 1/10 (0,5 ml en 4,5 ml de solución fisiológica). Se toman de ambos tubos alícuotas de 0,05 ml y se depositan en la superficie de placas de Petri que contengan algún medio apropiado para el desarrollo del microorganismo que se está

ensayando. Luego se diseminan con la ayuda de una espátula de Drigalski. A las 24-48 horas de incubación a 35°C, según el caso, se efectúa el recuento de colonias que aparecen en estas placas y se multiplica por la inversa de la dilución efectuada: en la primera por 2×10^3 y en la segunda por 2×10^4 . Los recuentos obtenidos deberán ser valorados según las siguientes pautas:

De los recuentos obtenidos en ambas placas conviene elegir aquel que dé valores intermedios entre 50 y 200 ufc por placa porque si fuera menor de 50 el error estadístico sería considerable ya que $E = 2/\sqrt{n} \times 100$, donde n es el número de colonias contadas. Por ejemplo, si fuera $25 \geq 2/\sqrt{25} \times 100 = 0,40 \rightarrow 40\%$. Si fuera mayor de 200, el error sistemático (mayor dificultad en el recuento y superposición de colonias) sería considerable.

4. Preparación de las diluciones de los antibióticos

Para elegir la cantidad de antibiótico a pesar, se deberá tener idea clara de cuáles serán las concentraciones a incluir en la batería de tubos. Si éstas fueran 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,06 y 0,03, el tubo correspondiente a la dilución final a partir del cual iniciar las diluciones debiera contener 16 µg/ml. De este modo, para facilitar la tarea, se pueden pesar 16 mg del antibiótico, disolverlo en 1 ml del solvente apropiado (ver tabla 1), diluir 1/10 (0,5 ml en 4,5 ml de medio de cultivo, agua o solución fisiológica) para que quede una concentración de 1,6 mg/ml. Volver a diluir 1/100 (0,05 ml en 5 ml de medio de cultivo) para tener los 16 µg/ml que se deseaban. Para obtener las diluciones correspondientes en la batería de tubos, se procede de la manera indicada en la figura 1. Se toman 10 tubos de vidrio estériles. Se distribuye 0,5 ml del medio de cultivo en todos los tubos menos en el primero. Se toma 1 ml de la solución de 16 µg/ml del antibiótico y se reparte entre el primero y el segundo tubo (0,5 ml en cada uno). En este último se mezcla con los 0,5 ml de medio de cultivo y se transfiere 0,5 ml de esta mezcla al tercer tubo, donde se vuelve a mezclar y a transferir 0,5 ml al cuarto tubo y así sucesivamente, hasta llegar al octavo tubo. En este punto los 0,5 ml de la mezcla, no se transfieren al noveno tubo sino que se descartan.

Las concentraciones del antibiótico son, entonces, del doble de lo deseado (ver Tabla 1):

Tabla 1. Concentraciones del antibiótico en los tubos de una prueba de sensibilidad por macrodilución en medio líquido

Tubo N°1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración del antibiótico en µg/ml	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0	0

El tubo 10 es el destinado a controlar el inóculo bacteriano y en él debe observarse turbiedad al momento de la lectura. El tubo 11 es opcional y sirve como control de esterilidad (Fig.1). Puede ser más práctico incubar el frasco de medio del que se tomaron las alícuotas correspondientes para usarlo como control de esterilidad.

Para determinar la CBM, es necesario conocer con precisión el tamaño del inóculo colocado inicialmente. Esto lo registramos efectuando el recuento de colonias de las placas, procedimiento descrito más arriba.

En el momento de la lectura de la CIM se efectúa la siembra de 0,1 ml de cada uno de los tubos límpidos en un medio sólido apropiado con la ayuda de una espátula de Drigalski.

Se debe verificar la pureza del inóculo para certificar que no exista algún desarrollo extraño en los tubos turbios. Para ello se efectúan estrías en hemiplacas de un medio sólido apropiado, a partir del último tubo turbio y del tubo control. En caso de aparición de otro germen, aún en forma de microorganismo acompañante, la prueba queda invalidada.

Se deberán tener en cuenta las siguientes pautas:

- La concentración más alta que se podría esperar en un tubo límpido es de 10^7 ufc/ml (si fuera mayor se hubiera notado turbiedad).
- La mayor precisión en el recuento la debemos tener a tres órdenes de magnitud por debajo del inóculo inicial en virtud de la definición de CBM.
- No conviene trabajar con inóculos menores o iguales a 10^4 ufc/ml. En caso de verificar esta diferencia respecto al inóculo inicialmente estimado (5×10^5 ufc/ml), la prueba quedará invalidada.
- No es correcto efectuar el recuento de colonias tomando una gota de la suspensión con ansa calibrada y diseminando en medio sólido, ya que el error sistemático puede llegar al 100%.

Control de calidad

Objetivos

- Determinar la precisión y exactitud del método.
- Determinar si los reactivos empleados se encuentran en condiciones adecuadas.
- Determinar la idoneidad del personal afectado para efectuar las pruebas y para interpretar los resultados.

Controles previos:

- (1) Estado y calidad de la droga en polvo a emplear, teniendo en cuenta su fecha de vencimiento.
- (2) Identificación de cada antibiótico y su potencia.
- (3) Conservación de las cepas de referencia: deben estar conservadas a -80°C en leche descremada estéril, caldo glicerinado, sangre de conejo estéril (*Haemophilus influenzae*) o sangre de carnero estéril (*Streptococcus pneumoniae*), según el caso. Se deberán dar dos pases antes de utilizarlas en las pruebas. Se pueden mantener también en agar estría por no más de dos semanas a $2-4^{\circ}\text{C}$.

Frecuencia de ensayos con cepas de referencia

Se determinará la CIM de cada antibiótico para las bacterias de referencia cada vez que se efectúen cambios en los reactivos. En casos de uso rutinario de esta técnica, efectuar controles semanales. Las cepas de referencia son: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 (para combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* 29212 (para control de timidina del medio), *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 (para cefaclor, cefprozil, cefuroxima, imipenem y meropenem) y *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (para estreptococos).

Pruebas de sensibilidad por microdilución en medio líquido

El método es equivalente al de macrodilución. La diferencia radica en que se trabaja con volúmenes menores, en placas de microdilución. Esto permite (si se trabaja con pipeta multicanal) realizar el procedimiento con mayor rapidez. La desventaja de este método es que el resultado que se obtiene para CIM, y especialmente para CBM, adolece de un error estadístico mayor que el que afecta a la macrodilución (ver arriba). También, al trabajar con volúmenes menores, pueden no detectarse mutantes resistentes que se encuentren en baja concentración respecto a la población mayoritariamente sensible.

Preparación de las diluciones del antibiótico

La preparación de la solución del antibiótico que va a servir como punto de partida para la serie de pocillos correspondientes se efectúa según lo visto en el método de macrodilución. Lo que cambia es el volumen de medio (50 µl) (con pipeta multicanal) y la cantidad de solución del antibiótico (50 µl) que se deposita en cada pocillo. De esta manera se efectúan las diluciones que terminan en el penúltimo pocillo con una micropipeta de 50 µl.

El inóculo se distribuye en cantidades equivalentes al volumen de líquido que contiene cada pocillo (50µl) con pipeta multicanal. Para cubrir los 96 pocillos, se deberá preparar un volumen de 5 ml de inóculo en una bandeja estéril. Preferentemente, preparar 10 ml para que la pipeta multicanal no tenga problemas en pescar líquido sin burbujas, sobre todo en las últimas instancias. La incubación se efectúa como para macrodilución pero cubriendo los pocillos con *parafilm*.

La lectura se realiza por observación de turbiedad. Para ello conviene ayudarse con un lector de microplacas o, al menos, con un sistema de iluminación adecuado.

La CBM se puede determinar repicando en placas de un medio de cultivo sólido apropiado un volumen de 10 µl del caldo de cada pocillo. Si el inóculo inicial fuera 5×10^5 ufc/ml, la concentración bacteriana que queda viable a las 18-24 h debe ser de 5×10^2 ufc/ml, si el descenso hubiera sido del

99,9% (punto de corte para considerar la CBM). Si se sembraran 100 μ l como en método de macrodilución, observaríamos 50 colonias (error del 28%). En cambio, para microdilución se siembran 10 μ l y se obtienen 5 colonias (error cercano al 100%).

Bibliografía específica

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed., M07-A10, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

CAPÍTULO 3

Pruebas de sensibilidad por dilución en medio sólido

Objetivo

El objetivo de este método es poder ensayar el mayor número de cepas bacterianas posible, frente a un número discreto de antibióticos. Esto se realiza, fundamentalmente, en estudios epidemiológicos en los que se quiere observar el comportamiento de cierto tipo de bacterias frente a los antibióticos o cuando se produce el lanzamiento de un nuevo antibiótico del cual se quiere comprobar su efectividad, frente a distinto tipo de bacterias de diferentes zonas geográficas.

Medios de cultivo

1. Bacterias no exigentes de crecimiento rápido

Se utiliza el agar Mueller Hinton (MH). Este medio se suspende en agua, se esteriliza por autoclave y se distribuye en botellas en volúmenes de 9,5 o 19 ml, dependiendo del número de cepas a ensayar. Si fueran 23 o menos, se elige utilizar 9,5 ml. Si fueran entre 23 y 48, se elige utilizar 19 ml para utilizar placas de 15 cm de diámetro.

Se prepararán en total n frascos, donde $n = (y \times z) + x$. Y es el número de antibióticos a ensayar, z el número de diluciones a efectuar y x el número de placas de control sin antibióticos a emplear.

2. Bacterias exigentes

2.1. *Haemophilus*

Se utiliza el agar HTM, cuya preparación es la misma que la indicada para los métodos de dilución en medio líquido, pero con el agregado de 15 g/l de agar. En este caso se le agrega 0,5 ml de la solución de NAD en forma estéril a los tubos fundidos y enfriados a 50°C, que deberán contener 9 o 18 ml del medio basal, según si se utilizan placas de 10 ó 15 cm de diámetro.

2.2. *Streptococcus spp.* y *Neisseria meningitidis*

A 9 o 18 ml de agar Mueller Hinton fundido y enfriado a 50°C, se le agrega 0,5 ml de sangre ovina desfibrinada. Si se emplea para determinar la sensibilidad al cotrimoxazol, deberá reemplazarse por 0,5 ml de sangre equina lisada por congelamiento y descongelamiento.

Preparación del inóculo

Se parte de una suspensión bacteriana de turbiedad equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. Se diluye 1/10 (0,1ml en 0,9 de caldo o solución fisiológica) y de este modo se obtiene la suspensión final, que aplicada con un replicador de Steers (Fig. 1) sobre cada una de las placas, representa una concentración de 10^4 ufc/gota.



Figura 1. Replicador de Steers. En la placa cuadrada se colocan los inóculos bacterianos tomados por las puntas que se ven por debajo del mango. Esas puntas se mueven verticalmente, como para mojarse con los inóculos y, al desplazarse la base, inocular las placas, que tendrán concentraciones crecientes del antibiótico incorporadas.

Preparación de las diluciones de los antibióticos

Las diluciones de los antibióticos se van a distribuir en los tubos o frascos, en una relación 1/20, respecto al medio de cultivo, cuando éste se encuentre en estado líquido y a 50°C.

Se ejemplificará con el caso de una preparación de un ensayo para 46 cepas de *Streptococcus spp.* A frascos con 18 ml de agar Mueller Hinton fundido y enfriado a 50°C se le agrega 1 ml de sangre ovina desfibrinada estéril y 1ml de cada una de las correspondientes diluciones.

Supongamos que deseamos ensayar una serie de 10 concentraciones que van desde 8 mg/l a 0,015 mg/l. Para ello, el tubo con la dilución que se agregará al primer tubo de la serie tendrá que

tener una concentración del antibiótico 20 veces superior a la buscada (160 mg/l para tener 8 mg/l al mezclar 1 ml de la dilución con 18 ml de agar Mueller Hinton y 1ml de sangre ovina). Una manera cómoda de obtener esta dilución es pesar 16 mg de la droga (descontando los excipientes según el dato de su potencia), disolverla en el solvente apropiado (ver tabla en normas del CLSI) y diluir 0,1 ml en 10 ml de agua destilada estéril (1/100) = 160 mg/l.

A posteriori se efectúan los siguientes pasos:

Concentración inicial 160 mg/ml en un volumen de 10 ml

Se toman:

- 1ml + 19 ml de agar MH + sangre
- 8 mg/l finales
- 1ml + 1 ml de agua → 1ml + 19 ml
- 4 mg/l finales
- 1ml + 3 ml de agua → 1ml + 19 ml
- 2 mg/l finales
- 1ml + 7 ml de agua → 1ml + 19 ml
- 1 mg/l finales



De esta solución, tomar:

- 0,5 mg/l { 1ml + 1ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre
- 0,25 mg/l { 1ml + 3 ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre
- 0,125 mg/l { 1 ml + 7 ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre



De esta solución, tomar:

- 0,06 mg/l { 1ml + 1ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre
- 0,03 mg/l { 1ml + 3 ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre
- 0,015 mg/l { 1 ml + 7 ml de agua 1 ml + 19 ml de agar MH + sangre

Y así sucesivamente.

Bibliografía específica

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed., M07-A10, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

CAPÍTULO 4

Poder bactericida del suero

La determinación del **poder bactericida del suero** (PBS) es una prueba que estudia la interacción entre el microorganismo infectante, el antibiótico administrado y el suero del paciente. Tiene por objetivo, precisamente, conocer si el suero del paciente al que se le ha administrado uno o más antibióticos es capaz de ejercer una acción bactericida sobre la bacteria infectante. Este suero puede ser extraído en diferentes tiempos respecto a la administración del antibiótico (por ejemplo, en el pico y/o en el valle de la concentración del antibiótico).

Es indispensable que el Laboratorio de Microbiología haya conservado el microorganismo aislado de ese paciente en particular, y que se coordine con el personal médico y/o de enfermería que lo atiende, para establecer día y horario de las extracciones.

Se estudia la capacidad bactericida del suero cuando el antimicrobiano ha alcanzado (teóricamente), concentraciones máximas (pico) y mínimas (valle). Para obtener la muestra en el pico de concentración sérica, se debe extraer sangre del paciente a los 15 minutos de administrada la dosis del antibiótico, si la droga es de administración endovenosa, 30 minutos si es intramuscular y 60 minutos si se da por vía oral. Para la muestra del valle, la toma debe hacerse justo antes de administrar la próxima dosis.

Se deben enviar más de 2 ml de sangre en tubo seco y estéril al laboratorio. Se preparan diluciones al medio en caldo MH con el suero (igual que como se realiza con la suspensión inicial del antibiótico en una prueba de dilución en medio líquido). A éstas se le agrega un inóculo bacteriano (de la bacteria obtenida del paciente), como para tener una concentración final de 10^5 – 10^6 ufc/ml. Se incuba 18–24h y se efectúa la lectura de turbiedad. La inversa de la dilución del tubo en el que no se observó turbiedad es el **poder inhibitorio del suero**.

Se subcultivan los tubos límpidos en placas con el medio de cultivo adecuado, según el germen. A las 24-48h, según el caso, se efectúa el recuento de colonias, que se compara con el del inóculo inicial, previamente realizado. Como en el caso de la CBM, el **PBS** es la inversa de la dilución del suero que logre disminuir el inóculo inicial en un 99,9%.

Si bien esta prueba se ha empleado tratando de predecir el éxito o el fracaso del tratamiento en osteomielitis y endocarditis, los resultados no han sido concluyentes. No obstante, un poder bactericida ≥ 16 en el pico sérico en endocarditis, es un dato que permite suponer que el tratamiento

es correcto. Del mismo modo, un PBS ≥ 2 en el valle, en un caso de osteomielitis, permite suponer que el paciente tendrá una buena evolución.

La mayor utilidad está en conocer si el suero de un paciente tratado con dos o tres antibióticos resulta bactericida para el microorganismo infectante.

Bibliografía específica

Stratton CW. Serum bactericidal test. Clin Microbiol Rev. 1988; 1: 19–26.

CAPÍTULO 5

Pruebas de sensibilidad por difusión

Pruebas de sensibilidad por difusión con discos

Medios de cultivo

1. Bacterias no exigentes de crecimiento rápido: Agar Mueller Hinton

2. Bacterias exigentes

2.1. *Haemophilus*: Agar HTM

2.2. Estreptococos: Agar Mueller Hinton con 5% de sangre ovina.

Verificar que las placas estén secas antes de ser inoculadas.

Preparación del inóculo

1. Método convencional

Colocar 4 o 5 colonias del microorganismo en caldo Mueller Hinton a 35°C y dejar crecer hasta la turbiedad (aproximadamente 4 horas). Ajustar la turbiedad con el patrón N° 0,5 de la escala de McFarland.

2. Método alternativo

Tomar colonias aisladas de un desarrollo en medio sólido de 18-24 horas y preparar, directamente, una suspensión que tenga la turbiedad del patrón N°0,5 de la escala de McFarland.

Inoculación y colocación de los discos

Sumergir un hisopo en la suspensión, rotar la punta de algodón sobre las paredes del tubo y dispersar el inóculo en la placa en tres direcciones. No demorar más de 15 minutos en la colocación de los discos, para no dar ventaja al desarrollo bacteriano sobre la inhibición de los antibióticos (falsa resistencia).

Aplicar los discos manualmente, con pinza o con ayuda de un multiaplicador. No colocar más de 7 discos por placa, para placas de 100 mm y bacterias de crecimiento rápido. Llevar a estufa. No dejar pasar más de 15 minutos a temperatura ambiente, antes de llevar a la estufa, para no dar ventaja a la difusión de los antibióticos en el agar, sobre el desarrollo bacteriano (falsa sensibilidad).

Además de los tradicionales discos de papel de varias marcas, existen tabletas Rosco que se aplican y sus resultados se interpretan del mismo modo. Tienen la ventaja de que se almacenan a temperatura ambiente y tienen un período de vida útil más prolongado.

Incubación y lectura

Bacterias de crecimiento rápido, excepto estafilococos: una noche a 35°C al aire.

Estreptococos, *Neisseria* y *Haemophilus*: una noche a 35°C, en 5% de CO₂.

Se efectúa con calibre o, en su defecto, con regla. Se anota el diámetro de cada halo de inhibición en mm y se compara con los datos de las tablas del CLSI, para determinar la correspondiente interpretación (resistencia = R, sensibilidad intermedia = I, sensibilidad = S).

Comentario

Este método sólo se recomienda al efectuar pruebas de sensibilidad en estafilococos, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Enterococcus* spp., estreptococos, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas* (estos últimos tres, con algunas limitaciones respecto a ciertos antibióticos).

Variables que intervienen en el método de difusión con discos

En el cuadro 1 se pueden ver las variables que hay que tener en cuenta para lograr la estandarización de este método.

Cuadro 1. Variables que intervienen en el método de difusión con discos

Variables relativas a la composición del medio de cultivo
Contenido de timidina (controlar con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212)
Contenido de cationes divalentes: Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ (controlar con bacterias de referencia. <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> 25923 y <i>P. aeruginosa</i>)

Variables relativas a la preparación del medio de cultivo
Preparar las placas de modo que quede un espesor de 4mm en toda la placa (controlar con calibre).
Variables relativas al inóculo
El inóculo debe oscilar entre 1 y 2×10^8 ufc/ml (Utilizar un nefelómetro o comparar con el patrón de turbiedad N°0,5 de McFarland)
Variables relativas a los discos
Verificar que el disco que se esté utilizando sea el que tiene la carga correcta para este estudio (por ejemplo, hay discos de penicilina de 2UI y los que se usan habitualmente son de 10UI).
Conservar en freezer a -20°C y con desecador, los cartuchos que constituyen el stock, y a 4°C los que están en uso (verificar que no estén húmedos o hayan perdido potencia, a través de pruebas periódicas con las cepas de referencia).
Variables relativas al procedimiento
Controlar que se coloquen los discos a las placas antes de los 15 minutos de haber sido inoculadas.
Controlar que las placas se pongan a incubar a $35-37^{\circ}\text{C}$ antes de los 15 minutos de haber sido colocados los discos.
Incubar el tiempo justo que se indica en las guías.
Variables relativas a la lectura
Realizarla con calibre y estandarizando el método por comparación entre diferentes observadores.

Método epsilométrico

Este método fue desarrollado en Suecia y comercializado primariamente por AB Biodisk, Solna, Suecia, bajo el nombre de Etest. Hoy es comercializado por Biomérieux y se han agregado otras marcas al mercado (por ejemplo, MICE Oxoid, MIC Test Strip, Liofilchem Diagnostici). Consiste en la realización de pruebas de sensibilidad por difusión, utilizando tiras especiales que contienen un gradiente del antibiótico a ensayar.

Medios de cultivo

1. Bacterias no exigentes de crecimiento rápido: Agar Mueller Hinton.
2. Bacterias exigentes.

- 2.1. *Haemophilus* spp.: Agar HTM o Agar Mueller Hinton + 1% de hemoglobina.
- 2.2. Estreptococos: Agar Mueller Hinton, con 5% de sangre ovina.
- 2.3. *Neisseria meningitidis*: Agar Mueller Hinton, con 5% de sangre ovina.
- 2.4. Grupo ACEK: Agar Brucella.
- 2.5. *Pasteurella* spp: Agar Mueller Hinton, con 5% de sangre ovina.

Preparación del inóculo

Método convencional

Colocar 4 o 5 colonias del microorganismo en caldo Mueller Hinton a 35°C y dejar crecer hasta la turbiedad (aproximadamente 4 horas). Ajustar la turbiedad con el patrón N° 0,5 de la escala de McFarland.

Método alternativo

Tomar colonias aisladas de un desarrollo en medio sólido de 18-24 horas y preparar directamente una suspensión que tenga la turbiedad del patrón N°0,5 de la escala de Mc Farland.

Bacterias del grupo ACEK

Resuspender en solución fisiológica varias colonias desarrolladas en medio sólido (agar chocolate) durante 48 horas, hasta alcanzar la turbiedad del tubo N°1 de la escala de McFarland.

Inoculación y colocación de las tiras

Sumergir un hisopo en la suspensión, rotar la punta de algodón sobre las paredes del tubo y dispersar el inóculo en la placa, en tres direcciones. Dejar secar (no más de 15 minutos).

Aplicar las tiras manualmente, con pinza o con ayuda de un aplicador. No colocar más de 2 tiras por placa de 10 cm ni más de 6 por placa de 15 cm. Llevar a estufa. No dejar pasar más de 15 minutos a temperatura ambiente.

Incubación y lectura

Microorganismos de crecimiento rápido, excepto estafilococos: una noche a 35°C al aire.

Estreptococos, *Neisseria*, ACEK y *Haemophilus*: una noche a 35°C en 5% de CO₂.

Se determina la CIM en el punto de intersección entre la línea del halo de inhibición y cada uno de los lados de la tira. Si hubiera discrepancia entre los datos obtenidos en uno y otro lado, se toma como válida la CIM más elevada de las dos. Si se obtuvieran datos intermedios entre las potencias de

dos, características del método de dilución, el resultado se aproxima al valor próximo más elevado. Por ejemplo, si da 1,5, la interpretación es 2,0 a los efectos del informe.

La interpretación R, I o S se obtiene de las tablas de CLSI, para el método de dilución (Fig.1).

Se utilizan los mismos controles de calidad que para las pruebas de dilución.

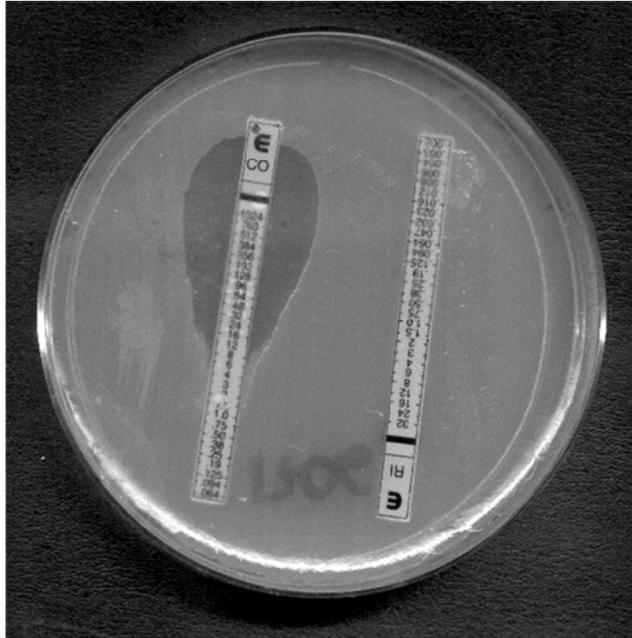


Figura 1. Ensayo de Etest de una cepa de *Acinetobacter baumannii* con rifampicina (R, CIM >32 µg/ml) y colistina (R, CIM = 8 µg/ml). Nótese la discrepancia entre el punto de lectura del lado izquierdo de la tira de colistina (CIM = 8 µg/ml – que es el que se considera válido) y del derecho (CIM = 6 µg/ml).

Bibliografía específica

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 12th ed, M02-A12, CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

CAPÍTULO 6

Curvas de muerte

Objetivos

Las curvas de muerte tienen por objetivo determinar la actividad bactericida de un antibiótico o de una combinación de antibióticos, sobre una bacteria determinada.

a. Medios de cultivo

a.1. Para bacterias no exigentes de crecimiento rápido

Se utiliza el caldo Mueller Hinton. El medio se prepara en botellas, en cantidades medidas (80 ml). De este modo, el medio se puede utilizar como base para efectuar el agregado de suplementos necesarios a fin de realizar pruebas con microorganismos más exigentes. El agregado de cationes divalentes ($\text{Ca}^{++} = 20\text{-}25 \text{ meq/l}$ $\text{Mg}^{++} = 10\text{-}12,5 \text{ meq/l}$) es esencial para la realización de estas pruebas, en especial cuando se ensayan aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

a.2. Para bacterias exigentes

Para *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Neisseria meningitidis*, se utiliza caldo Mueller Hinton adicionado de 2 a 5% de sangre equina lisada por congelamiento y descongelamiento.

Para *Haemophilus* se utiliza el caldo HTM.

b. Preparación del inóculo

b.1. Método clásico (optativo para bacterias de crecimiento rápido)

A partir de un desarrollo en medio sólido, se prepara una suspensión en caldo Mueller Hinton con 5 colonias de igual aspecto. Se deja incubar entre 3 y 5 horas (hasta turbiedad visible), a 35°C, y se ajusta con el patrón N° 0,5 de la escala de McFarland que equivale a $1,5 \times 10^8$ ufc/ml.

b.2. Método alternativo (optativo para bacterias de crecimiento rápido, obligatorio para bacterias exigentes y estafilococos)

A partir de un desarrollo en medio sólido de no más de 24 horas, se prepara una suspensión con un número discreto de colonias, de modo tal que su turbiedad se equipare con la del patrón N° 0,5 de la escala de McFarland. El medio a utilizar también debe ser caldo Mueller Hinton. El inóculo así preparado no debe mantenerse más de 15 minutos cuando se trabaja con *H. influenzae* o *S. pneumoniae*. Otros microorganismos se pueden dejar a temperatura ambiente, hasta un máximo de 3 horas.

b.3. Preparación del inóculo final

El inóculo bacteriano a colocar en los tubos debe ser muy inferior en recuento de colonias al inóculo preparado inicialmente (0,5 de McFarland). La concentración deseada es de 1×10^6 ufc/ml. Para ello se realiza una dilución 1/100 del inóculo original (0,05 ml sobre 5 ml de cada uno de los tubos con caldo del ensayo).

b.4. Preparación de las soluciones de antibióticos

Primero se eligen las concentraciones de los antibióticos a ensayar, que en general serán múltiplos de la CIM de cada uno de ellos.

Para el caso de combinaciones, se prueban los antibióticos a ensayar en las concentraciones deseadas, por separado, frente a la cepa en estudio y sus combinaciones en las mismas concentraciones que por separado.

Cuando se ensayan aminoglucósidos, en combinación con β -lactámicos frente a cocos gram positivos catalasa negativos, la concentración del aminoglucósido deberá ser menor que el valor de su CIM, y por el contrario, la del β -lactámico coincidirá con el valor de la CIM o será superior a él. Se tratará que estas concentraciones sean fácilmente obtenibles en el suero del paciente, en forma sostenida.

Se pesa una cantidad de antibiótico que, en general, será la necesaria para preparar una solución de 100 a 1000 veces más concentrada que la que se desea probar, teniendo en cuenta la potencia de la droga. La droga sólida pesada se disolverá primero en el solvente adecuado (ver Tabla 1), en un volumen mínimo. La dilución final del antibiótico se realizará en caldo Mueller Hinton o caldo Mueller Hinton suplementado, según el microorganismo a ensayar. Por ejemplo, si se quiere probar una concentración final de penicilina de 5 μ g/ml con una potencia de 100%, se pesa 1 mg de penicilina y se disuelve en 2 ml de agua destilada estéril (concentración = 0,5 mg/ml), ésta se diluirá 1/100 en caldo Mueller Hinton solo o suplementado con sangre equina lisada en el tubo del ensayo final.

En una prueba de sinergia de una combinación de dos antibióticos, tendremos 4 tubos de reacción:

- 1°) Tubo con antibiótico A.
- 2°) Tubo con antibiótico B.
- 3°) Tubo con A+B.

4°) Tubo control (sin antibióticos).

c. Procedimiento

c1. Agregado del inóculo y los antibióticos

A cada uno de los tubos con 5 ml de caldo Mueller Hinton o caldo Mueller Hinton suplementado con sangre equina lisada, se agrega 0,05 ml de las soluciones con las concentraciones requeridas de los antibióticos y luego los 0,05 ml del inóculo.

c2. Incubación

La incubación de los tubos se efectúa a 35°C, en atmósfera normal hasta las 24 horas, a menos que se indiquen otras condiciones según el microorganismo involucrado. Se toman alícuotas de los tubos a distintos tiempos, las que se diluyen apropiadamente, y se siembran sobre placas con los medios apropiados para cada microorganismo, como para poder efectuar los recuentos de colonias. Como mínimo se deberán tomar muestras a las 4 y 24 horas, aunque es preferible hacerlo a las 3, 6, 18 y 24 horas.

c3. Lectura

Se efectúa la observación de los tubos a ojo desnudo a las 4 y 24 horas, reconociendo la turbiedad de los tubos y realizando las diluciones que se detallan a continuación, según se observe turbiedad o no.

Para el tiempo igual a cero (t=0) de la curva de la muerte

Para medir la concentración del tubo control a $t = 0$, se efectúan 2 diluciones, una 1/100 (0,05 ml del tubo control en 5 ml de solución fisiológica) y 1/10 de la solución anterior de 1/100 (0,5 ml en 4,5 ml de solución fisiológica). Se toman de ambos tubos alícuotas de 0,05 ml y se depositan en la superficie de placas de Petri que contengan algún medio apropiado para el desarrollo del microorganismo que se está ensayando. Luego se diseminan con la ayuda de una espátula de Drigalski. A las 48 horas de incubación a 35°C en atmósfera apropiada (*S. pneumoniae* y *S. viridans* requieren atmósfera al 5% de CO₂), se efectúa el recuento de colonias que aparecen en estas placas y se multiplica por la dilución efectuada: en la primera 2×10^3 , en la segunda por 2×10^4 . Los recuentos obtenidos deberán ser valorados según la siguiente pauta: de los recuentos obtenidos en ambas placas, conviene elegir aquél que dé valores intermedios entre 50 y 200 ufc por placa.

Para el tiempo igual 4 horas (t = 4) y 24 horas (t = 24) de la curva de muerte

Luego de las 4 o 24 horas de incubación para aquellos tubos que permanecen lípidos (tubos en los cuales alguno de los antibióticos tiene, al menos, acción bacteriostática sobre el microorganismo), se realizan las siguientes diluciones, para realizar el recuento de microorganismos:

- 1º) 1/10 (0,1 ml del tubo turbio en 0,9 ml de solución fisiológica).
- 2º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).
- 3º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).
- 4º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).

El tubo original y todas las diluciones realizadas se siembran 0,05 ml en una placa de Petri, con el medio apropiado para el desarrollo del microorganismo que se está ensayando y se disemina con espátula de Drigalski. A las 48 horas de incubación a 35°C, en la atmósfera adecuada, según el caso, se efectúa el recuento de colonias y se multiplica por la inversa de la dilución efectuada: en la primera 20, en la segunda 2×10^2 , en la tercera 2×10^3 , en la cuarta 2×10^4 y en la última dilución 2×10^5 .

Este método se utiliza para gérmenes donde se espera una rápida bactericidia (por ejemplo *S. pyogenes*), para otros gérmenes se puede obviar el recuento de los 2 primeros tubos.

Para los tubos que luego de la incubación se encuentran **turbios** (tubo control y aquellos en los cuales ningún antibiótico tuvo efecto bactericida), se espera una concentración mayor a 5×10^7 ufc/ml. Para realizar el recuento de colonias, se realizan las siguientes diluciones:

- 1º) 1/100 (0,5 ml en 0,05 ml de solución fisiológica).
- 2º) 1/100 (0,5 ml de la suspensión anterior, en 0,05 ml de solución fisiológica).
- 3º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).
- 4º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).
- 5º) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior, en 0,9 ml de solución fisiológica).

A partir de la segunda dilución, se siembra con 0,05 ml de cada uno de los tubos, en una placa de Petri, con el medio apropiado para el desarrollo del microorganismo que se está ensayando. A las 48 horas de incubación a 35°C en la atmósfera adecuada, según el caso, se efectúa el recuento de colonias y se multiplica por la inversa de la dilución efectuada: en la primera 2×10^5 , en la segunda 2×10^6 , en la tercera 2×10^7 y en la cuarta 2×10^8 .

c4. Resultados

Los resultados de las determinaciones de tiempo de muerte se muestran graficando log ufc/ml vs. tiempo. El efecto bactericida individual para un solo antibiótico se define como el descenso de 2 log o más, en las ufc/ml respecto al inóculo inicial. Si esto no ocurre, se dice que la bacteria es tolerante, aunque para ello es necesario comparar la actividad bactericida del antibiótico frente a una cepa de referencia de la misma especie. De este modo, si la pendiente es más abrupta, en el caso de la bacteria de referencia, se dice que la bacteria es tolerante.

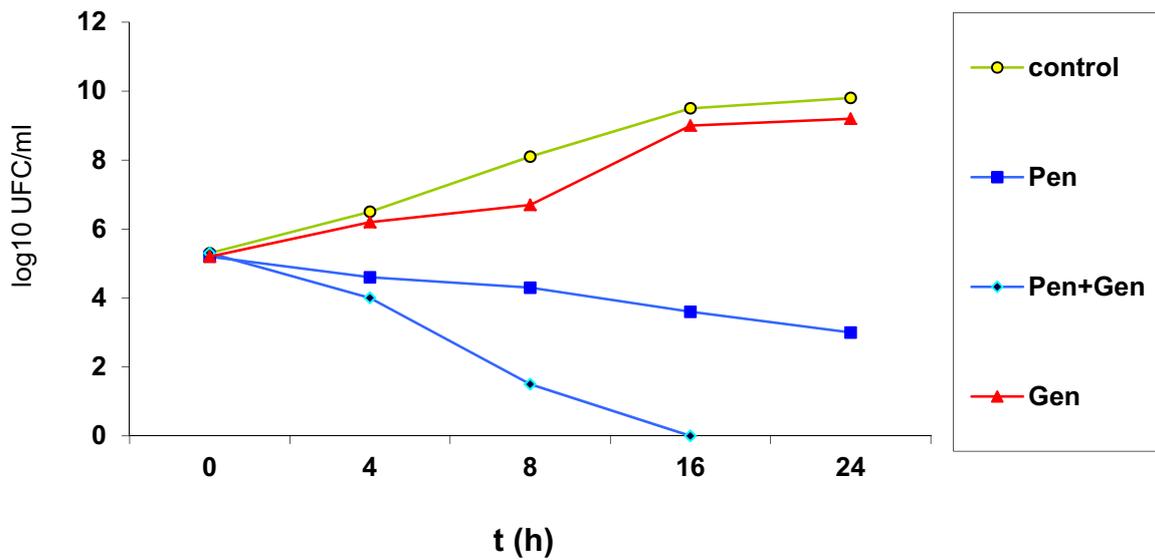


Figura 1. Curva de muerte para penicilina (Pen), gentamicina (Gen) y su combinación (Pen+Gen) en una cepa de enterococo sensible a la acción sinérgica.

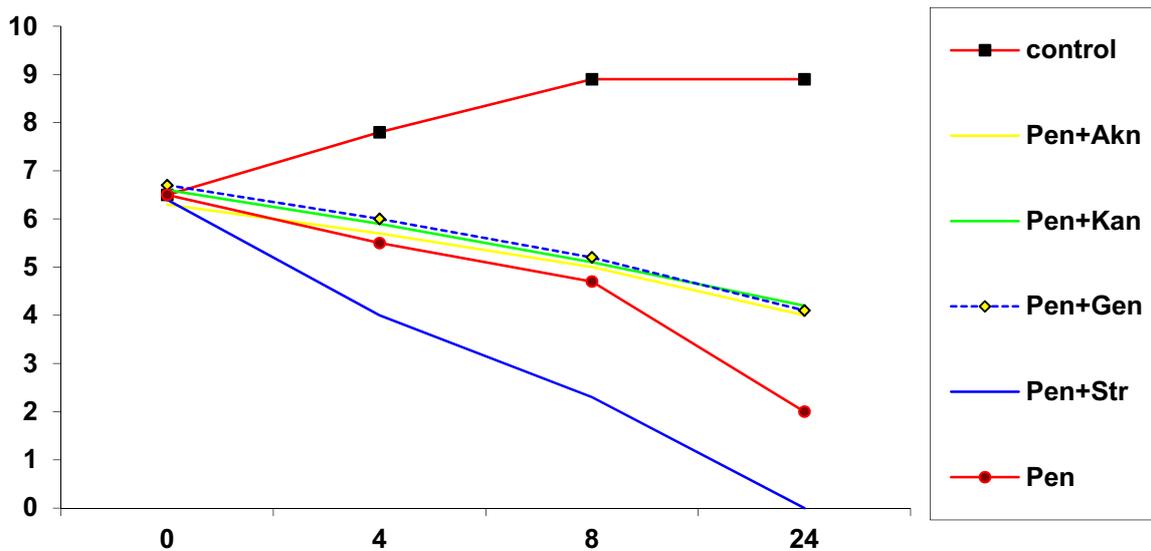


Figura 2. Curva de muerte para penicilina (Pen) y sus combinaciones con gentamicina (Pen+Gen), kanamicina (Pen+Kan), amicacina (Pen+Akn) y estreptomina (Pen+Str), en una cepa de enterococo sensible sólo a la acción sinérgica de la estreptomina.

El efecto sinérgico de la combinación de drogas, se define como la disminución en 2 log de ufc/ml respecto a la lograda por su componente más activo a las 24 horas y, a la vez, respecto al inóculo original (tubo control a t = 0, Fig 1 y 2).

Efecto carry-over

El efecto *carry-over* se define como el arrastre del antibiótico, que puede ocurrir desde el tubo a las placas de los recuentos. Este efecto queda neutralizado, frecuentemente, por las diluciones que se realizan antes de inocular las placas. No obstante, para asegurarse, el operador puede realizar algunos procedimientos para neutralizarlo y para comprobarlo.

Neutralización del efecto *carry-over*

Si el antibiótico ensayado es un beta-lactámico, se puede agregar a la placa una concentración útil de una beta-lactamasa activa frente a dicho antibiótico. Su uso está limitado porque no todas las beta-lactamasas sirven y porque hay que disponer de la preparación adecuada al momento del ensayo.

Comprobar el efecto *carry-over*

- 1) Con un ansa se deposita una gota de cada tubo en una placa con un medio adecuado, se deja absorber durante unos minutos y luego se hace una estría con un ansa. Si hubiera efecto *carry over*, se vería la inhibición del crecimiento bacteriano que aparecería en la estría, por ocupar un espacio libre de antibióticos.
- 2) Depositar una gota de cada tubo en una placa sembrada con una bacteria muy sensible al antibiótico. Si se ve inhibición a las 24 h de incubación, se demuestra el efecto *carry-over* y los recuentos no resultan válidos.

Bibliografía

- Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved standard M26A. Vol 19. N°18. CLSI, Wayne, PA, EE.UU., 1999.
- Jorgensen JH, Crawford SA, Fiebelkorn KR.** Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 antimicrobial agents and characterization of resistance mechanisms affecting some agents. J Clin Microbiol 2005; 43: 3162-3171.
- Kugler KC, Biedenbach DJ, Jones RN.** Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 73-76.
- Lorian V.** (ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1996.

Bibliografía general

- Asociación Argentina de Microbiología y Universidad Nacional de Entre Ríos;** Módulos del Curso a distancia sobre Microbiología (manual).1998.
- Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S.** Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 2006.
- De la Maza L, Pezzlo MT, Shigei JT, Tan GL, Peterson EM.** Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press, Washington DC, EE. UU. 2013.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS.** Bailey & Scott's Diagnóstico Microbiológico. 12a. ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2009.
- Isenberg HD.** Essential procedures for Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D.C., 1998.
- Mac Faddin J. F.** Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3a. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, EE.UU., 2000.
- Mandell GL, Douglas RG, Dolin R (ed.).** Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. 7th ed., New York, NY, Churchill Livingstone, 2010.
- Paganini HR.** Infectología pediátrica. Editorial Científica Interamericana, Buenos Aires, 2007.
- Versalovic J, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW,** editors. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC.** Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6ta ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2008.

APENDICE I

Coloraciones

I. Coloración de Gram

“Los estudios sobre Schizomycetes han sido significativamente mejorados por el uso de este método. Por ello es que publico mis resultados, aunque soy conciente que ellos son breves y tienen muchos errores. Es de esperarse que este método sea útil en las manos de otros colegas”.

Gram, C. Ueber die Isolirte. Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und trocken-präparaten. Fortschritte der Medicin 1884;2: 185-189.

1) **Cristal violeta.**

Solución A

Cristal violeta.....40 g

Etanol.....400 ml

Solución B

Oxalato de amonio.....16 g

Agua destilada.....3.600 ml

Mezclar A + B. Filtrar. Dejar en reposo 24 horas a 37°C antes de usar

2) **Solución de Lugol**

Yodo30 g

IK.....60 g

Etanol.....750 ml

Agua destilada.....2.250 ml

3) **Alcohol-acetona**

Acetona.....1.200 ml

Etanol.....2.800 ml

4) **Safranina**

Safranina.....10 g

Etanol	400 ml
Agua destilada.....	4.000 ml

Procedimiento

1. Efectuar un extendido con el material a colorear sobre un portaobjetos nuevo y limpio.
2. Fijar por acción de la llama de un mechero o por tratamiento con metanol durante un minuto.
3. Si se hubiera optado por el método de fijación a la llama, dejar enfriar el portaobjetos.
4. Cubrir el preparado completamente con la solución de cristal violeta.
5. Dejar actuar 30 segundos.
6. Lavar con agua de la canilla.
7. Cubrir con solución de Lugol.
8. Dejar un minuto.
9. Lavar con chorros de alcohol-acetona, bajo canilla hasta que no fluya más el cristal violeta por fuera del portaobjetos.
10. Terminar de lavar con agua.
11. Cubrir con solución de safranina.
12. Dejar actuar 30 segundos.
13. Lavar con abundante agua.
14. Dejar secar al aire. Puede utilizarse aire caliente o incubación en estufa. No conviene el uso de toallas de papel o papel de filtro para el secado de los portaobjetos porque puede dañarse el preparado.

Control de calidad

Preparar una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en solución fisiológica. Efectuar el extendido con una gota de la mezcla bacteriana y colorear junto con los portaobjetos que se van a emplear para el diagnóstico de muestras clínicas. Los portaobjetos que se preparan con la mezcla de microorganismos secados al aire, pueden conservarse indefinidamente a temperatura ambiente en cajas cerradas.

II. Coloración de Ziehl-Neelsen

1) Fucsina fenicada

Solución A

Fucsina básica.....10 g

Alcohol etílico.....100 ml
Mezclar y disolver en frasco tapado. Mantener a 37°C de un día para otro.

Solución B

Fenol fundido.....5,7 ml
Agua destilada.....100 ml

Solución de uso: Mezclar 10 ml de la solución A con 100 ml de la solución B.

2) Solución decolorante (mezcla alcohol-ácido)

Alcohol absoluto.....970 ml
Ácido clorhídrico concentrado.....30 ml

3) Contracolorante (azul de metileno)

Azul de metileno.....1g
Alcohol etílico de 95°C.....100 ml
Agua destilada.....900 ml

Procedimiento

1. Preparar los extendidos sobre portaobjetos nuevos y limpios.
2. Fijar al calor de la llama de un mechero.
3. Cubrir con solución de fucsina fenicada.
4. Calentar el portaobjetos con ayuda de un hisopo embebido en alcohol y encendido. El calentamiento se debe prolongar hasta la aparición de vapores blancos.
5. Dejar actuar cinco minutos.
6. Lavar con agua destilada.
7. Cubrir con solución decolorante.
8. Dejar uno o dos minutos. Si los preparados fueran gruesos, agregar más solución decolorante, hasta que no se libere más fucsina
9. Cubrir con solución de azul de metileno.
10. Dejar veinte minutos.
11. Lavar con agua destilada.

Control de calidad

Utilizar cultivos en caldo 7H9 de una micobacteria y una cepa de *Nocardia* sp., perfectamente identificadas. Colocar una gota de cada una de ellas en los extremos de un mismo portaobjetos. Colorear junto con los portaobjetos que se van a emplear para el diagnóstico de muestras clínicas. La micobacteria deberá verse roja, mientras que la nocardia deberá verse azul

III. Coloración fluorescente con solución de auramina

1) Solución de Auramina

Solución A

Auramina O.....1 g
Alcohol de 95°100 ml
Disolver

Solución B

Fenol al 90%.....33 ml
Agua destilada.....867 ml

Mezclar A + B

Filtrar

2) Solución de contraste

Permanganato de potasio.....5 g
Agua destilada.....1000 ml
Disolver completamente y conservar a temperatura ambiente.

3) Solución decolorante

Agua destilada200 ml
Alcohol de 95°800 ml
HCl.....5 ml
Conservar a temperatura ambiente

Procedimiento

1. Preparar un frotis sobre un portaobjetos nuevo y limpio.
2. Fijar el preparado al calor de la llama de un mechero.
3. Cubrir con la solución de auramina por 15 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Decolorar durante 2 minutos.
6. Lavar con agua destilada.
7. Cubrir con la solución de contraste y dejar 5 minutos.
8. Lavar, dejar secar y observar con microscopio de fluorescencia.

Control de calidad: Ver coloración de Ziehl-Neelsen

IV. Coloración fluorescente con naranja de acridina

Solución buffer acético-acetato (pH = 4 – 4,3)

Solución A

Ácido acético glacial.....8,5 ml
Agua destilada.....1600 ml

Solución B

Acetato de sodio trihidratado.....11,3 g
Agua destilada.....400 ml

Mezclar A + B

Solución stock de naranja de acridina

Naranja de acridina.....1 g
Agua destilada.....100 ml
Conservar en heladera a 4°C

Solución de uso

Agregar 20 ml de solución stock de naranja de acridina a 2000 ml de solución *buffer* A+B.

Procedimiento

- 1) Fijar el material con metanol durante un minuto.
- 2) Cubrir con la solución de uso de naranja de acridina.
- 3) Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
- 4) Examinar el preparado con microscopio de fluorescencia.

Resultado: Las bacterias se verán de color naranja fluorescente.

Control de calidad

Colorear un cultivo bacteriano cualquiera, desarrollado en medio líquido junto a los preparados de las muestras. Observar la presencia de bacterias fluorescentes, con morfología equivalente a la de la bacteria utilizada.

APÉNDICE II

Medios de cultivo

Medios para micobacterias

Medio de Löwenstein- Jensen

Composición

Tabla 1. Solución A

Componentes	Peso por litro
Fosfato monopotásico	2,4 g
Sulfato de magnesio	0,24 g
Citrato de magnesio	0,60 g
Asparagina	3,60 g
Glicerina	12 ml
Agua destilada	600 ml

Se agregan las drogas en pequeña cantidad de agua, luego se agrega la glicerina y el resto de agua. Se esteriliza durante una hora, a vapor fluente, y se deja en reposo una noche.

Solución B

Se adicionan 30g de fécula de papa a la solución A y se lleva a baño María, hirviendo durante 10 minutos, con agitación continua. Luego se lleva a baño María de 56°C, durante una hora.

Se lavan 20 huevos en solución de carbonato de sodio al 5% y luego con agua y jabón, empleando cepillo. Finalmente, se les pasa un algodón embebido en alcohol.

Se rompen los huevos, de a uno, colocándolos en un mortero estéril. Se mezclan bien y luego se colocan en un frasco que contiene perlas de vidrio para homogeneizar todo. Se añade la solución B,

se mezcla, se agregan 20 ml de verde de malaquita al 2%, se agita y se filtra en forma aséptica, a través de gasa estéril. Se coagula a 85°C durante una hora en posición inclinada.

Los tubos así preparados se incuban durante 24hs a 37°C y luego otras 24hs. a temperatura ambiente. Se desechan los tubos contaminados, los estériles se conservan en heladera.

Medio de Stonebrink

Composición

Este medio tiene un método de preparación similar al de Lowenstein-Jensen. Se caracteriza por presentar piruvato de sodio en su fórmula, sustancia que lo hace apto para el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (Tabla 2).

Tabla 2. Composición del medio de Stonebrink

Componentes	Peso por litro
Fosfato monopotásico	7 g
Fosfato disódico	4 g
Piruvato de sodio	12,5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver las drogas, llevar a pH 6,5 con NaOH al 5%.

Llevar a autoclave durante 25 minutos a 110°C. Luego adicionar a 250ml. de esa solución, 10 huevos, 25 ml de verde de malaquita al 2%. Entubar y luego calentar a 85°C para coagular.

Siembra

Colocar aproximadamente 0,2 ml. del sedimento neutralizado de una muestra para investigación de bacilo de Koch en cada uno de los medios. Incubar durante 24-48 h. a 37°C hasta que se haya evaporado el líquido, luego quemar el tapón de algodón, si lo tuviera, introducir el resto del algodón no quemado y tapar con tapón de goma. Si se tratara de un frasco comercial con tapa a rosca, ajustar dicha tapa.

Incubación

Incubar durante 60 días a 37°C, con observación diaria del desarrollo durante la primera semana y luego en forma semanal.

Medios para gram positivos

Agar sangre (con 5% de sangre ovina)

Objetivo

Medio utilizado para la determinación de las reacciones hemolíticas de los microorganismos. La sangre ovina estéril también aporta factores de crecimiento y posee un cierto efecto protector para muchas bacterias, ya que anula los efectos tóxicos de los radicales libres producidos en los medios calentados.

Medio basal

Se utiliza un medio exento de carbohidratos, el recomendado es el Agar Columbia EH Difco por su capacidad de intensificar la hemólisis (Tabla 3). En su defecto, se podrá utilizar agar Columbia o agar tripteína de soja.

Tabla 3. Composición del Agar Columbia EH Difco (por litro)

Componentes	Peso por litro
Pantona	12 g
Bitona H PLUS	6 g
Digerido enzimático de tejido animal	3 g
Almidón	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar agar	12 g
pH : 7.3 +/- 0.1	

Aditivo: Sangre ovina desfibrinada estéril

Preparación

- Disolver 39 g de medio (Agar Columbia EH) en 1000 ml de agua destilada.
- Homogeneizar.
- Esterilizar 15 minutos a 121°C.
- Enfriar a 50°C.
- Agregar 50 ml de sangre ovina llevada a temperatura ambiente.
- Homogeneizar.
- Plaquear.

Interpretación de los resultados

Observación de la hemólisis

Hemólisis alfa: Destrucción parcial de los glóbulos rojos cerca de la colonia, acompañada de una coloración verde a marrón del medio.

Hemólisis beta: Zona clara, incolora, alrededor de la colonia del microorganismo por destrucción completa de los glóbulos rojos.

Hemólisis gamma (ausencia de hemólisis): No se produce actividad hemolítica ni decoloración por la colonia del microorganismo.

Hemólisis alfa prima: Un pequeño halo de células intactas o parcialmente hemolisadas adyacente a la colonia bacteriana, rodeado por una zona de hemólisis completa. Se debe interpretar como una variedad de la hemólisis alfa.

Control de calidad

- *Control de esterilidad:* Incubar una noche a 37°C. Verificar ausencia de desarrollo.
- *Control de pH:* Macerar en agua destilada y tomar con pHmetro o, en su defecto, con tiras reactivas.

Control de hemólisis:

- Beta-hemólisis: *S. pyogenes* ATCC 19615.
- Gamma: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Alfa: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Agar chocolate

Medio base

Agar Base Columbia (en su defecto, puede usarse agar infusión cerebro corazón, agar Brucella o agar tripteína de soja).

Aditivos: Sangre equina desfibrinada o, en su defecto, sangre humana al 5%, calentadas a 80°C.

Preparación

1. Disolver 44 g de medio en 1000 ml de agua destilada.
2. Homogeneizar.
3. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.
4. Enfriar a 80°C. Mantener a esa temperatura durante 10 minutos.
5. Agregar 50 ml de sangre equina o humana llevada a temperatura ambiente.
6. Homogeneizar.
7. Dejar enfriar hasta temperatura de plaqueo (55°C - 60°C).
8. Plaquear.

Control de calidad

- *Control de esterilidad:* Incubar una noche a 37°C. Verificar ausencia de desarrollo.
- *Control de crecimiento:* *H. influenzae* ATCC 10211.
- *Control de pH:* Macerar en agua destilada y tomar con pHmetro o, en su defecto, con tiras reactivas. Verificar que éste sea de 7,3 +/- 0,1.

Medio de Chapman (Agar manitol salado)

Fundamento

Es un medio selectivo para estafilococos patógenos. Permite establecer si un estafilococo crece en este medio y/o fermenta el manitol. Debido a la concentración extremadamente alta de sal, permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentran, entre otros, los del género *Staphylococcus*. La degradación de manitol, con formación de ácido, sirve, como

indicativo de la presencia de *Staphylococcus aureus*. Aunque algunas otras especies pueden también producir colonias amarillas por fermentación de este azúcar.

Siembra: Se realiza en superficie por estrías, sobre el medio de cultivo en placa.

Incubación: Hasta 3 días a 35°C.

Resultados

Colonias con halo amarillo y crecimiento intenso, implica que el microorganismo es manitol positivo (Fig.1).

Colonias que no producen cambio de color en el medio y casi siempre presentan crecimiento débil, implica que el microorganismo es manitol negativo.

Composición

Tabla 4. Composición del medio de Chapman

Componentes	Peso por litro
Extracto de carne	1g
Pluripeptona	10g
D-manitol	10g
Cloruro de sodio	75 g
Agar	15 g
Rojo de fenol.	0,025
pH : 7,4+/- 0,1	

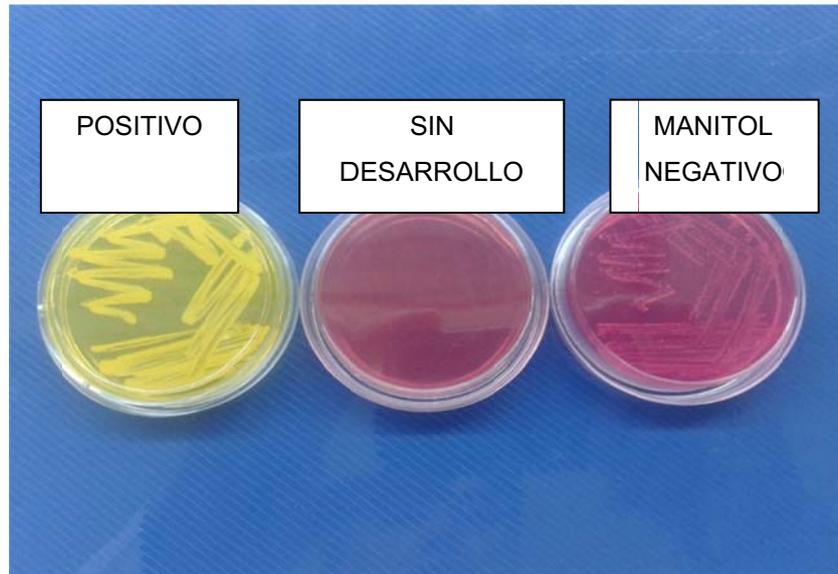


Figura 1. Distintos resultados obtenidos con el medio de Chapman. Izquierda = *Staphylococcus aureus*, tolerante al NaCl y manitol positivo (colonias amarillas). Centro = bacteria no tolerante al NaCl (sin desarrollo). Derecha: *Staphylococcus epidermidis*, tolerante al NaCl y manitol negativo (colonias rojas o rosadas).

Agar sangre con colistina y ácido nalidíxico

Objetivo

Es un medio selectivo para el aislamiento de microorganismos gram positivos a partir de muestras que presenten flora polimicrobiana. Contiene antibióticos que inhiben la flora gram negativa.

El agar sangre permite el desarrollo de la mayoría de los microorganismos gram positivos, dependiendo para ello de la atmósfera de incubación a la que se los someta.

El uso de ácido nalidíxico y colistina también puede hacerse agregándoselos a un caldo de cultivo para efectuar un enriquecimiento previo, en gram positivos (por ejemplo, búsqueda de enterococos resistentes a vancomicina).

Tabla 5. Agar sangre con colistina y ácido nalidíxico

Componentes	Peso por litro
Agar Columbia Britania	44 g
Sangre ovina estéril	50 ml
Colistina	10g
Ácido nalidíxico	10 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH : 7,3+/- 0,1	

Preparación

- Pesar el agar Columbia deshidratado.
- Suspenderlo en 1 litro de agua destilada.
- Esterilizar durante 125°C, durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a 50°C.
- Agregar la sangre ovina y los antibióticos.
- Fraccionar en placas de Petri estériles, a razón de 10 a 15 ml por placa.
- Dejar enfriar.
- Conservar en heladera a 4°C, no más de 15-20 días.

Control de calidad

No efectuar control de esterilidad, dado que a 37°C pueden inactivarse los antibióticos.

Realizar estrías con cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* de colección. Incubar 24 hs a 35°C. Las dos primeras no deberían desarrollar; las dos últimas sí.

Medios para bacilos gram negativos

Agar eosina con azul de metileno (EMB o medio de Levine)

Fundamento

Es un medio diferencial, poco selectivo utilizado para aislar y detectar enterobacterias en muestras mixtas. Efectúa la diferenciación entre microorganismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo. El medio contiene dos colorantes: eosina y azul de metileno, que inhiben a las bacterias gram positivas y actúan con el cambio de pH como indicadores de la fermentación de la lactosa. Así, en este medio los fermentadores fuertes de la lactosa como *E.coli* producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico muy características, en tanto que los productores más débiles de ácidos: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* dan lugar a colonias de color violeta. Los no fermentadores de lactosa producen colonias transparentes.

Incubación: 24 - 48 h a 35-37° C.

Preparación

1. Pesar las cantidades indicadas.
2. Disolver en agua destilada.
3. Homogeneizar.
4. Plaquear.

Tabla 6. Composición del agar eosina azul de metileno

Componentes	Peso por litro
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
K ₂ PO ₄ H	2 g
Agar	15 g
Eosina	0,4 g
Azul de metileno	65 µg
Agua destilada	csp. 1000 ml
pH: 7,2+/-0,2	

Las placas con el medio de cultivo son de color púrpura anaranjado verdoso.

Sembrar finamente las placas, por el procedimiento de estría con ansa.

Control de calidad

Control de esterilidad: Incubar una noche a 37°C. Verificar ausencia de desarrollo.

Control de las propiedades del medio:

E. coli ATCC 25922 colonias violáceas con brillo metálico.

Proteus mirabilis: Colonias transparentes.

Agar cistina lactosa deficiente en electrolitos (CLDE o CLED)

Fundamento

El CLDE o CLED es un medio diferencial, no selectivo, en el cual los microorganismos fermentadores de lactosa producen colonias amarillas, en tanto que los no fermentadores dan lugar a

colonias celestes. Esto es debido a que el medio contiene lactosa como fuente de carbono y azul de bromotimol como indicador de pH. Además, el medio es deficiente de electrolitos, lo que evita el desarrollo invasor (*swarming*) de los miembros del género *Proteus*.

Este es un medio muy utilizado para el aislamiento de bacterias a partir de muestras de orina.

Composición

Tabla 7. Composición del CLDE

Componentes	Peso por litro
Peptona	4 g
Extracto de carne	3 g
Clorhidrato de cistina	0,12 g
Tripeína	4 g
Azul de Bromotimol	0,02 g
Agar agar	15 g
Lactosa	10g

Resultados

Las colonias fermentadoras de lactosa se ven de color amarillo, mientras que las no fermentadoras se ven de color verde o verde azulado.

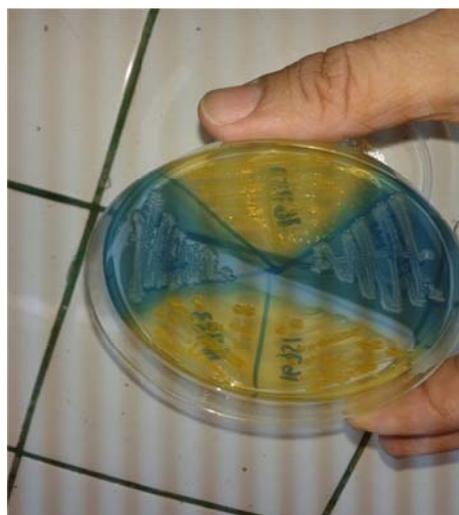


Figura 3. Placa de CLDE sembrada con bacilos gram negativos fermentadores (colonias amarillas) y no fermentadoras de lactosa (colonias verde-azuladas).

Agar Salmonella Shigella (SS)

Es un medio moderadamente selectivo y diferencial que inhibe a la mayoría de las enterobacterias fermentadoras de la lactosa (por ejemplo, *E. coli*) y permite el desarrollo de las especies de *Salmonella* y *Shigella*. Las sales biliares, el citrato de sodio y el verde brillante inhiben a las bacterias gram positivas y a muchas gram negativas (incluyendo a algunas enterobacterias). Además, éste es un medio diferencial, ya que posee lactosa como fuente de carbono y rojo neutro como indicador. De esta forma, los microorganismos fermentadores de lactosa producen colonias rojas y los no fermentadores, transparentes. Por otro lado, el medio contiene tiosulfato de sodio como fuente de azufre y una sal ferrosa, indicadora de la producción de H₂S por formación de FeS. Esta reacción se aprecia en la formación de puntos negros en el centro de las colonias productoras de H₂S. Este es un medio utilizado para coprocultivos.

Tabla 8. Composición del agar SS

Componentes	Peso por litro
Extracto de levadura	5 g
Proteosa-peptona	5 g
Citrato ferroso	1 g
Tiosulfato de sodio	8,5 g
Citrato de sodio	8,5 g
Sales biliares	8,5 g
Verde brillante	0,33 µg
Rojo neutro	0.025 µg
Lactosa	10g
Agar	13,5
Agua destilada	csp. 1.000 ml
pH: 7,2+/-0,2	

Nota: Este medio no se esteriliza en autoclave.

Agar Mac Conkey

Objetivos

Este medio se utiliza para aislamiento de bacilos gram negativos aerobios y facultativos de fácil desarrollo. Permite diferenciar las bacterias que utilizan la lactosa de aquellas que no lo hacen, tanto

en muestras clínicas, como en muestras de agua y de alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en este medio.

La mezcla de sales biliares y el cristal violeta inhiben gran parte de la microbiota gram positiva. Las colonias lactosa positivas son rojas debido al descenso de pH que produce la absorción del rojo neutro con un halo turbio, debido al precipitado de las sales biliares. Las colonias lactosa negativas son incoloras.

La siembra en medio Mac Conkey permite, además, diferenciar bacilos gram negativos facultativos u oxidativos de difícil desarrollo que no crecen en él (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, entre otros).

Tabla 9. Composición del agar Mac Conkey

Componentes	Peso por litro
Peptona de caseína	17,0
Peptona de carne	3,0
Lactosa	10,0
Mezcla de sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Agar	13,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
pH final: 7,1 ± 0,2	

Método de preparación

a.- En placas

1. Suspender 50 g de polvo por litro de agua destilada.
2. Dejar reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar.
3. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos, hasta disolver.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
5. Plaquear.

b.- En tubos.

1. Suspender 50g de polvo por litro de agua destilada.
2. Dejar reposar durante 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar.
3. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver.
4. Distribuir en tubos de hemólisis (4 ml por tubo).

5. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
6. Dejar solidificar en forma inclinada (pico de flauta).

Color del medio preparado: rojo púrpura

Siembra e incubación

Sembrar en superficie un inóculo ligero, incubar de acuerdo a la muestra a procesar.

Interpretación de los resultados y control de calidad

a. Placas

Tabla 10. Características de las colonias en agar Mac Conkey

Características de las colonias	Microorganismos
Incoloras/transparentes	<i>Salmonella, Shigella</i> , otros.
Grandes, rojas, halo turbio	<i>Escherichia coli</i> .
Grandes, rosadas, mucosas	<i>Enterobacter, Klebsiella</i> .
Diminutas, de crecimiento aislado, opacas	Enterococos, estafilococos, otros.

b. Tubos

Sólo debe observarse desarrollo o no desarrollo en medio de Mac Conkey. Para control de calidad utilizar *Pseudomonas aeruginosa* (desarrolla) y *Eikenella corrodens* (no desarrolla).

Agar Hektoen

Objetivo

Es un agar selectivo y diferencial para la demostración y aislamiento de bacterias intestinales patógenas, incluyendo *Shigella*, a partir de los más diversos materiales, tales como heces, alimentos y otros. Contiene salicina, lactosa y sacarosa.

Debido a los dos indicadores, azul de bromotimol y fucsina ácida, las colonias lactosa positivas muestran una expresiva diferencia cromática frente a las colonias lactosas negativas. Igualmente,

ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente la lactosa y más fácilmente la sacarosa y la salicina, lo que disminuye la falsa presunción de presencia de patógenos entéricos.

La combinación de tiosulfato y la sal de hierro como indicador, dan una coloración negra a las colonias productoras de ácido sulfhídrico. Las sales biliares inhiben gran parte de la flora acompañante. El Hektoen es un medio altamente diferencial, un poco menos inhibidor que el agar SS y resulta útil en combinación con el XLD para la búsqueda de *Salmonella*. Este medio ahorra tiempo al disminuir el número de pruebas bioquímicas a utilizar y disminuye el riesgo de perder un aislamiento de *Salmonella*.

Tabla 11. Composición del agar Hektoen

Componentes	Peso por litro
Proteosa peptona	12g
Cloruro sódico	5g
Extracto de levadura	3g
Sacarosa	12,0g
Salicina	2,0g
Lactosa	12,0g
Tiosulfato sódico	5,0g
Mezcla de sales biliares	2,0g
Citrato de amonio y hierro (III)	1,5g
Azul de bromotimol	0,064g
Fucsina ácida	0,04g
Agar	15
pH : 7,5+/- 0,1	

Preparación

1. Disolver 75g de medio en 1000 ml de agua destilada.
2. Homogeneizar (no autoclavar).
3. Plaquear.
4. Los medios de cultivos preparados son claros, de color azul verdoso.
5. Sembrar finamente las placas por el procedimiento de estrías con ansa.

Resultados

- Colonias incoloras, transparentes: *Shigella*, *Providencia*.
- Colonias grandes, rojas, rodeadas de un halo turbio: *Escherichia coli*.
- Colonias grandes, rosadas, mucosas: *Enterobacter*, *Klebsiella*.
- Colonias verde azuladas, de borde irregular, chatas: *Pseudomonas*
- Colonias verde azuladas, con o sin punto negro en el centro: *Salmonella*, *Proteus*.

El 50% de las cepas de *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus* fermentan la salicina, pero no así *C. freundii*. El 30% de las cepas de este grupo de especies fermenta la sacarosa y el 50 %, la lactosa. De este modo, desde un principio se descartan muchos aislamientos de *Citrobacter* productores de SH₂, ya que dan colonias amarillas con punto negro. El 97% de los aislamientos de *P. vulgaris* utiliza la sacarosa y el 50 % la salicina, mientras que el 15% de los de *Proteus mirabilis* fermenta la sacarosa y no utiliza la salicina. *M. morganii* no fermenta sacarosa ni salicina.

Control de calidad

- *Control de esterilidad*: Incubar una noche a 37°C. Verificar ausencia de desarrollo.
- *Control de medio de cultivo*:
 - Escherichia coli*: Buen crecimiento de colonias color rojo salmón.
 - Salmonella enterica*: Buen desarrollo de colonias verde azuladas con centro negro.

Agar sangre con ampicilina (medio selectivo y diferencial para *Aeromonas*)

Fundamento

Este medio se utiliza como medio selectivo para el aislamiento de *Aeromonas* a partir de muestras de materia fecal. Las especies de *Aeromonas*, a excepción de *Aeromonas trota*, son resistentes a la ampicilina y producen hemólisis en agar sangre. La ampicilina, además de inhibir a algunos otros microorganismos comensales o patógenos intestinales, es capaz de inhibir el crecimiento y *swarming* de muchas cepas de *Proteus mirabilis* que pudieran estar presentes.

Composición

Medio base: Agar Base Columbia.

Aditivos: Sangre humana al 5 %.

Solución de ampicilina: Concentración final de ampicilina 20 µg/ml.

Preparación de la solución de ampicilina: pesar 250 mg de ampicilina y disolver en 60 ml de agua destilada estéril.

Vencimiento: 30 días.

Conservar en heladera.

Preparación

- Disolver 44 g. del medio basal en 945 ml de agua destilada.
- Homogeneizar.
- Esterilizar en autoclave (121°C, 15 min).
- Enfriar a 55° C.
- Agregar 50 ml. de sangre humana a temperatura ambiente.
- Agregar 5 ml. de la solución de ampicilina.
- Homogeneizar.
- Plaquear.

Control de calidad

- *Control de esterilidad:* Incubar una noche a 37°C
- *Desarrollo con producción de β-hemólisis:* *Aeromonas* spp.
- *Inhibición de desarrollo:* *Escherichia coli* ATCC 25922

Medios para bacilos gram negativos no fermentadores

Agar Cetrimida (agar selectivo para *Pseudomonas*)

Fundamento

La cetrimida (Bromuro de cetiltrimetilamonio) sirve para conseguir una notable inhibición de la microbiota acompañante de *Pseudomonas* del grupo fluorescente. La concentración primitiva (0,1%) de la sustancia inhibidora ha sido disminuida con el fin de interferir aún menos en el desarrollo de *Pseudomonas*. El desarrollo de color a cargo de *Pseudomonas aeruginosa* cursa sin obstáculos en este medio de cultivo.

Uso e interpretación

Sembrar las placas o tubos en pico de flauta, en superficie, incubar hasta 48 h. a 35-37°C. Interesa consignar si la bacteria desarrolla o no en este medio. Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* pueden reconocerse de otros BNF porque desarrollan en este medio y generalmente forman un pigmento verde azulado (piocianina) y son fluorescentes a la luz UV.

Tabla 12. Composición del agar cetrimida

Componentes	Peso por litro
Peptona de gelatina	20g
Cloruro de magnesio	1,4g
Sulfato de potasio	10g
Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (cetrimida)	0,3g
Agar	13,6g
Aditivo: glicerina 10 ml	
pH : 7,5+/- 0,1	

Agar F (King B) y Agar P (King A)

Fundamento

El agar P para *Pseudomonas* favorece la formación de piocianina y disminuye la de fluoresceína. Por el contrario, el agar F estimula la formación de fluoresceína y disminuye la de piocianina. Ambos medios de cultivo, utilizados simultáneamente, permiten una identificación previa simple y rápida de la mayoría de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ya que muy pocas son apigmentadas. Algunas sólo pueden formar piocianina. Otras solamente fluoresceína y, por último, la mayoría son capaces de formar ambos pigmentos.

Tabla 13. Composición del Agar F

Componentes	Peso por litro
Peptona de caseína	10g
Peptona de carne	10g
Sulfato de magnesio	1,5g

Fosfato dipotásico	1,5
Agar	12g
Aditivo: glicerina 10 ml	

Tabla 14. Composición del Agar P

Componentes	Peso por litro
Peptona de gelatina	20g
Cloruro de magnesio	1,4g
Sulfato de potasio	10g
Agar	12,6g
Aditivo: glicerina 10 ml	

Uso e interpretación

Sembrar la superficie del medio con los cultivos a identificar. Incubar hasta una semana a 37°C. Durante el período de incubación se inspeccionan los cultivos a las 24, 48 y 72 h. y al cabo de 7 días.

Solamente *Pseudomonas aeruginosa* forma colonias sobre agar P, con una pigmentación azul hasta verde (piocianina) o de color rojo hasta pardo oscuro (piorrubina). Estos pigmentos pueden extraerse con cloroformo. Sobre el agar F aparecen colonias de *Pseudomonas* con pigmento amarillo a amarillo verdoso (fluoresceína) extraíble con agua. Estas pueden pertenecer a cualquiera de las tres especies fluorescentes. La formación simultánea de piocianina y fluoresceína da lugar a la aparición de un tono verde luminoso que muestra fluorescencia iluminando con luz ultravioleta.

Medios para Bordetella

Agar Bordet-Gengou comercial

Composición

Agar Bordet-Gengou: 30 g/l

Peptona: 10 g/l

Glicerol: 10 ml

Preparación

Esterilizar en frascos con tapón de algodón con gasa. Luego, cuando el medio alcanza una temperatura soportable al tacto, agregar la sangre desfibrinada de carnero o caballo (7-15%), homogeneizar y plaquear. Las placas ya preparadas, con el medio suplementado con sangre, son utilizables en la semana de preparadas (conservar a 4°C).

Agar Bordet-Gengou preparado en el laboratorio

Tabla 15. Composición del agar Bordet-Gengou

Componentes	Peso o volumen por 3 litros
Papa	375g
Glicerina	30 ml
Na Cl	36g
Proteosa peptona	12,0g
Agua destilada	c.s.p. 3.000ml
Agar	54g

Preparación

Colocar las papas peladas y cortadas en rodajas en un saco de gasa y hervir durante 30 minutos en 1,5 L de agua con la glicerina.

Retirar del fuego y dejar enfriar para que sedimente, quitando el saco con las papas.

Medir el volumen de líquido tratando de no arrastrar el sedimento y completar a 3 L agregando el NaCl. Agregar la peptona disuelta previamente en 1 L del mismo medio.

Esterilizar en frascos con tapón de algodón con gasa.

Luego, cuando el medio alcanza una temperatura soportable al tacto, agregar la sangre desfibrinada (7-15%), homogeneizar y plaquear.

Conservar en lugares frescos, evitando la deshidratación.

Medio de Regan y Lowe

Tabla 16. Composición del medio de Regan y Lowe

Componentes	Peso por litro
Extracto de carne	10g
Peptona de carne	10g
Almidón soluble	10g
Carbón activado	4g
Cloruro de sodio	5g
Ácido nicotínico	0,01g
Cefalexina	0,04g
Agar	15
pH : 7,4 +/- 0,2 a 25° C	
Sangre desfibrinada	75-150 ml

Conservar en lugares frescos, evitando la deshidratación.

Medios para anaerobios

Agar sangre con vitamina K (para anaerobios)

Tabla 17. Composición del agar sangre con vitamina K

Componentes	Peso por litro
Agar tripteína a de soja (TSA)	Pesar según indicación del fabricante como para preparar 1 litro
Extracto de levadura	5 g
Hemina	5 mg (1 ml de solución madre = 5 mg/ml)
Vitamina K	Concentración final 10 µg/ml
Agua destilada	csp. 1000ml

Suplementos:

Bicarbonato de sodio (para *Fusobacterium* y otros gram negativos): 0,1%.

Piruvato de sodio (para *Bilophila* y *Veillonella*): 0,1%.

Tween 80 (para gram positivos): 0,5%.

Sangre lacada de caballo.

Preparación

1. Pesar la cantidad de agar TSA indicada por el fabricante.
2. Agregar la hemina, la vitamina K, el extracto de levadura y el resto de suplementos.
3. Rehidratar con agua destilada.
4. Calentar suavemente hasta disolución.
5. Agregar la sangre lacada (por calentamiento y enfriamiento repetidos) (concentración final 5%).
6. Esterilizar a 121°C 15 min.
7. Plaquear.

Pueden usarse otras bases: Agar BHI, agar Columbia, agar Brucella, agar Schaedler.

Solución de hemina

- Hemina: 0,5g.
- Hidróxido de sodio 1N: 10ml.
- Agua destilada: 90ml.

Preparación

1. Disolver la hemina en la solución de hidróxido de sodio.
2. Llevar a 100ml con agua destilada.
3. Esterilizar en autoclave.

Vitamina K

Medio líquido cc final	0,1 µg/ml.
Medio sólido cc final	10 µg/ml.

Sangre lacada o hemolizada

Almacenar la sangre a -20°C.

Descongelarla a 37° C o bajo chorro de canilla y volverla a congelar.

Repetir este paso dos o tres veces.

Medios para hongos

Agar glucosado de Sabouraud

Objetivo y fundamento

Es el medio recomendado para el cultivo y desarrollo de hongos. El pH bajo favorece el crecimiento de los hongos sobre las bacterias. No contiene agentes selectivos en su formulación, pero pueden agregarse al medio.

Tabla 18. Composición del agar Sabouraud

Componentes	Peso por litro
Pluripeptona.	10g
Glucosa.	40g
Agar	15g
pH: 5,6+/-0,2	

Preparación

1. Pesar las cantidades de medio en polvo, siguiendo las indicaciones del fabricante.
2. Rehidratar con agua destilada.
3. Homogeneizar.
4. Distribuir en tubos de ensayo con tapón de algodón.
5. Esterilizar 15 minutos a 121°C.
6. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes.

El medio contenido en los tubos es color ámbar claro, ligeramente opalescente.

Control de calidad

Control de esterilidad: Incubar a 37°C durante toda la noche. Verificar ausencia de desarrollo

Control de crecimiento:

- *Aspergillus niger* buen crecimiento
- *Candida albicans* buen crecimiento

Medios para neisérias patógenas

Agar Thayer Martin

Objetivo

Es un medio enriquecido ideado para el desarrollo selectivo de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, a partir de muestras clínicas con microbiota bacteriana mixta. Se lo utiliza de rutina en la búsqueda de gonococo a partir de muestras endocervicales, uretrales, anales y faríngeas. Para el meningococo, prácticamente, sólo se usa en estudios epidemiológicos de portación nasofaríngea, dado que el resto de las muestras clínicas son monomicrobianas y no se requiere de la acción selectiva de los antibióticos que lleva en su composición.

Tabla 19. Composición del agar Thayer Martin

1) Medio base	
Componentes	Peso por litro
Proteosa peptona	15g
Almidón soluble	1g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato monopotásico	1g
Agar	15g
Agua destilada	csp. 1000 ml
pH final = 7,2	
2) Solución de hemoglobina al 2%.	
3) Suplementos estimulantes específicos del crecimiento	
IsoVitaleX, Polyvitex, TM Ildc, suplemento II de Merck: disolver en 2ml de agua destilada estéril	
4) Mezcla de antibióticos: disolver en 2ml de agua destilada estéril	
Antibiótico	Concentración final
Nistatina	12,5 mg/l

Vancomicina	3,0 mg/l
Colistina	7,5 mg/l
Trimetoprima	5,0 mg/l

Preparación

1. Pesar la cantidad necesaria del medio basal (agar Columbia) para preparar 200 ml de medio.
2. Disolver el medio en 200 ml de agua destilada.
3. Esterilizar a 121°C, 15 minutos.
4. Enfriar a 80°C.
5. Agregar 10 ml de sangre o hemoglobina al 2% (mantener a esa temperatura durante 5 minutos agitando, para hacer chocolate).
6. Agregar:
 Suplemento nutricional (IsoVitaleX/Polyvitex, TM Ildc, Britalex)
 Suplemento antibiótico (VCNT / TMI).
7. Plaquear.
8. Conservar a 4°C.

Interpretación de los resultados

Las colonias de gonococos y meningococos obtenidas en este medio selectivo son comúnmente opacas, grisáceas y convexas. Luego de 48h de incubación pueden transformarse en colonias mucoides.

Control de calidad

No efectuar control de esterilidad (pueden inactivarse los antibióticos).

Control positivo: Cepa de referencia de *N.gonorrhoeae*.

Control negativo: *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC25923.

Tabla 20. Composición del Suplemento II de Merck

Factores de crecimiento	Concentración en mg/ml
CIH de tiamina	0,003
L-glutamina	10,0
L-cistina	1,1
CIH de L-cisteína	25,9
Adenina	1,0
CIH de guanina	0,03
Acido p-aminobenzoico	0,013
Vitamina B ₁₂	0,01
Cocarboxilasa	0,1
NAD	0,25
Nitrato férrico	0,02

Medios para pruebas de sensibilidad a los antibióticos

Agar Mueller Hinton

Objetivo

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente, para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Esto es debido a que muestra buena reproducibilidad lote a lote, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas es bajo, y la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente.

Además, con el agregado de sangre es útil para la realización de pruebas de sensibilidad a los antibióticos de microorganismos nutricionalmente más exigentes.

Tabla 21. Composición del agar Mueller Hinton

Componentes	Peso por litro
Infusión de carne	3,0g
Hidrolizado de caseína	17,5g
Almidón	1,5g
Agar agar	17,0g
pH : 7,3 +/- 0,1	

Preparación

1. Disolver 38g de medio en polvo en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta disolución.
3. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121° C.
4. Enfriar a 50°C.
5. Homogeneizar.
6. Plaquear.

El medio preparado es color ámbar claro.

Control de calidad

Algunos lotes pueden variar significativamente y si las bacterias no crecen adecuadamente, las zonas de inhibición en las pruebas de difusión pueden ser más grandes, quedar fuera de los límites de control y obtenerse resultados erróneos.

Los medios que contienen excesiva cantidad de timidina o timina, pueden revertir el efecto inhibitorio de las sulfonamidas y trimetoprima, dando o no zonas de inhibición y, por lo tanto, resultados falsamente resistentes. Para evaluar el contenido de timidina se usa una cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con discos de trimetoprima-sulfametoxazol. Esta bacteria es capaz de incorporar timidina externa, un nucleótido clave para la biosíntesis de ácidos nucleicos, para lo cual se requiere fundamentalmente el ácido fólico. De este modo, aunque el antibiótico inhiba la síntesis del fólico, la bacteria es capaz de desarrollar correctamente por incorporación de la timidina del exterior.

Un medio satisfactorio da una zona clara de inhibición de 20 mm o más.

Otro aspecto de cuidado en el control de calidad en el agar Mueller Hinton es que las variaciones de cationes divalentes calcio, zinc y magnesio pueden afectar los resultados con tetraciclina, polimixina y aminoglucósidos, cuando se ensayan cepas de *Pseudomonas* spp. Por tal motivo, se efectúan pruebas de difusión con la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 y los resultados deben caer dentro de los límites permitidos por el CLSI.

Control de esterilidad: Incubar una noche a 37°C.

Agar Mueller Hinton con 5% de sangre ovina

Objetivo

Medio utilizado para algunas especies que no desarrollan satisfactoriamente en el agar Mueller Hinton no suplementado, especialmente estreptococos (ver recomendaciones del CLSI).

Preparación

1. Disolver 38g de medio en 1000 ml. de agua destilada.
2. Homogeneizar.
3. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121° C.
4. Enfriar a 45°C.
5. Agregar 50 ml de sangre de carnero mantenida a temperatura ambiente.
6. Homogeneizar.
7. Plaquear.

Patrones de turbiedad de McFarland

Tabla 22. Preparación de los patrones de turbiedad (escala de Mc Farland)

Estándar	Ba Cl ₂ 1% Vol (ml)	SO ₄ H ₂ 0,18M (1% v/v) Vol (ml)	Correspondencia con la conc. bacteriana (x 10 ⁸ ufc/ml)
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

APÉNDICE III

Pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas para la identificación de micobacterias

Pigmentación

Se siembra la cepa en estudio en dos tubos de medio Löwenstein-Jensen, a uno de los cuales se lo envuelve en papel negro y ambos se incuban a 37°C hasta aparición de desarrollo en el tubo sin envolver, entonces éste solamente, se expone durante una hora a la luz de una lámpara de 50w a 50cm de distancia y se vuelve a incubar por otras 24 h.

Estamos en presencia de una cepa fotocromógena, cuando el cultivo expuesto a la luz presenta un color amarillo o naranja, mientras el incubado en la oscuridad tiene un tono blanco crema.

Se dice que una cepa es escotocromógena cuando ambos tubos muestran pigmentación amarilla o naranja.

Prueba de la niacina

Reactivos: Disolver 0,5g de ácido p-aminosalicílico en 50 ml de agua destilada. Agregar solución de cianuro de potasio al 10% gota a gota al agua de bromo, hasta decoloración total.

Técnica. Agregar 1ml de agua destilada a un cultivo de 30-40 días, que posea desarrollo confluyente. Dejar los tubos 30 minutos en posición horizontal. Extraer 0,5 ml del líquido, agregar 0,15ml de la solución de bromuro de cianógeno.

Resultados. Es positivo cuando desarrolla color amarillo. Es negativo cuando es incoloro.

Peroxidasas y catalasas

Técnica: Agregar sobre las colonias partes iguales de pirocatecol en solución acuosa al 2% y agua oxigenada al 1% con 0,1 de su volumen Tween 80 al 10%.

Resultado: El ennegrecimiento de las colonias luego de aproximadamente 30 minutos, indica peroxidasa positiva.

El desprendimiento de gas en la superficie indica que el microorganismo es catalasa positivo.

Reducción de nitratos a nitritos

Técnica: Emplear cultivos en Löwenstein-Jensen de 3-4 semanas. Hacer una suspensión de la cepa en *buffer* de fosfatos M/15 ajustado a un pH 7,0, de manera de tener 10 mg de bacterias (peso húmedo) por ml. Adicionar 1ml de solución de nitrato de sodio 0,02 M en *buffer* de fosfatos M/156 y pH=7,0. Mezclar e incubar durante 4 horas a la temperatura de 37°C.

Agregar una gota de ácido clorhídrico concentrado diluido al medio, dos gotas de solución acuosa de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina. Mezclar.

Resultados: El desarrollo de un color rojo-violeta más o menos intenso (de acuerdo a la cantidad de nitratos reducidos) indica que el resultado es positivo. Si permanece incoloro significa que no hubo reducción de los nitratos.

Pruebas bioquímicas para la identificación de cocos gram positivos

Catalasa

Prueba rutinaria en portaobjetos a temperatura ambiente

Con un palillo de madera o plástico tomar material del centro de una colonia del microorganismo a ensayar y colocarlo sobre un portaobjetos limpio.

- a. Colocar una gota de H_2O_2 sobre estos microorganismos depositados en el portaobjetos.
- b. Observar el burbujeo (prueba positiva) producido por la liberación de gas o no (prueba negativa)

Precauciones:

No invertir la secuencia

No emplear colonias desarrolladas en agar sangre o hacerlo comparando con las burbujas que se desprenden al colocar trocitos del medio en la gota de H_2O_2 .

Prueba en tubo

Se utiliza un cultivo en agar en pico de flauta con 10 a 24 h. de incubación (los cultivos viejos dan reacciones incorrectas). Se vuelca 1 ml de una solución al 3% de agua oxigenada sobre las

colonias y se deja el tubo en posición inclinada. La reacción es positiva cuando aparece un rápido burbujeo gaseoso.

Control de calidad para ambos métodos

Se realiza la prueba con la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (negativa) y con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (positiva)

Prueba de la bencidina

Esta prueba sirve como confirmatoria de la prueba de la catalasa.

Reactivos: A) Solución de H₂ O₂ al 5% (fresca, de preparación semanal).

B) Solución de bencidina: Se disuelve parcialmente 1,0 g de diclorhidrato de bencidina en 20 ml de ácido acético glacial. Se agregan 30 ml de agua destilada y se calienta suavemente. Se enfría y se adicionan 50 ml de etanol al 95%. El reactivo permanece estable por lo menos un mes a 4 °C (una débil coloración amarilla no lo afecta).

Medio: Agar tripteína de soja con un aislamiento en estrías de las cepas en estudio de 24-48 h. de incubación.

Procedimiento: Se inundan las placas con el reactivo B. Una vez que los cultivos se contactaron perfectamente con la solución de bencidina, se agrega igual volumen del reactivo A.

Resultado positivo: El cultivo se colorea de un azul-verdoso intenso o verde oscuro. La prueba de la bencidina detecta la presencia de los citocromos a, b, c y d en las cepas en estudio.

Control positivo: *Micrococcus* spp. o *Staphylococcus* spp. (excepto *S.aureus* subsp. *anaerobius*).

Control negativo: *Enterococcus faecalis*.

Prueba de la coagulasa

Prueba en tubo

a.- Colocar 0,5 ml de plasma humano o de conejo con EDTA como anticoagulante. Se puede usar plasma humano no diluido, si se demuestra su capacidad coagulante y la ausencia de inhibidores con la cepa de referencia.

b.- Agregar 0,5 ml de un cultivo en caldo o una ansada densa obtenida de una placa de agar de la bacteria a ensayar.

c.- Rotar suavemente sin agitar.

d.- Incubar a 35-37°C. Leer a las 4 y a las 24 h, anotando si se observa un coágulo evidente o no.

En cualquier momento que se observe el coágulo, la prueba se considera positiva, pues puede ser negativa a las 4 horas por defecto de inóculo y positivizarse a las 24 horas, o ser positiva a las 4 horas y por presencia de fibrinolisisina, degradarse el coágulo, y dar un resultado negativo a las 24 horas.

Prueba en portaobjetos (*clumping factor*)

Procedimiento: Colocar una gota de plasma humano o de conejo sobre un portaobjetos. Suspende el desarrollo de una o dos colonias del estafilococo en el plasma, agitando con la ayuda de un palillo o un ansa. Observar a los 10 segundos la formación de grumos (prueba positiva) o la persistencia de una suspensión homogénea (prueba negativa).

Reacción de la DNasa.

El agar DNA se dispone en cápsulas de Petri. Se efectúa una estría con la bacteria a ensayar sobre la superficie del medio. Se deja incubar a 37°C. Luego se vuelca sobre la superficie desarrollada una solución de HCl 1N.

Prueba positiva: Se observa un halo transparente alrededor de la estría (degradación del ADN).

Prueba negativa: Se observa todo el medio turbio, inclusive alrededor de la estría.

Prueba no interpretable: No se observa desarrollo visible de la bacteria en la estría o no se observa turbiedad en ninguna zona de la placa.

Prueba de la fosfatasa alcalina

Método 1

Se prepara una solución al 1% de monofosfato sódico de fenolftaleína en agua destilada. La solución se esteriliza por filtración (este sustrato es mucho más estable que el difosfato sódico). Se toman 2 ml de esta solución y se agregan a 100 ml de agar nutritivo (entre 45 – 50°C). Concentración final, 0,02 % pH = 6,9. Se siembra por estrías o con multiinoculador de agujas móviles, hasta 7 cepas/placa, para evitar superposiciones en la lectura. Se incuba durante 24 h a 35° C.

Revelado: se colocan una o dos gotas de amoníaco concentrado en la tapa de la placa exponiendo el cultivo a los vapores.

Resultado positivo: Aparece en el cultivo, en forma casi inmediata, un color rosado intenso que difunde al medio, ante la liberación de la fenolftaleína por la fosfatasa.

Resultado negativo: La estría o “spot” no cambia de color, o adquiere un leve color rosado en los bordes o debajo de la siembra.

La lectura se realiza hasta los 15–20 minutos.

Control positivo: S. aureus

Control negativo: S. saprophyticus

Método 2

Se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato en fósforo inorgánico y p-nitrofenol catalizada por la fosfatasa en medio alcalino.

Se pueden utilizar los equipos comerciales disponibles, el Fosfatest 405 o el ALP 405 de Laboratorios Wiener. Se disuelven completamente sendos comprimidos en 4,5 ml y 2,5 ml de la solución *buffer* respectiva. Se fraccionan en tubos de hemólisis a razón de 0,5 y 0,25 ml respectivamente (trabajar estérilmente y conservar a 4 °C hasta 30 días). Suspender 2 a 4 colonias de la cepa en estudio en el tubo e incubar a 35 °C durante 24 h.

Resultado positivo: aparición del color amarillo del p-nitrofenol.

Resultado negativo: sin cambio.

Controles positivo y negativo: iguales que para el método 1.

Método 3

Se basa en el uso de tabletas Rosco. Se prepara una suspensión densa del microorganismo problema (McFarland # 4) en 0,25 ml de solución fisiológica estéril. Se agrega una tableta de fosfatasa alcalina y se incuba a 35°C durante un máximo de 4 horas.

Prueba positiva: color amarillo fuerte

Prueba negativa: incolora o color amarillo pálido

Controles positivo y negativo: iguales que para el método 1.

Se basa en el mismo criterio que el método 2.

Prueba de la beta-galactosidasa (ONPG)

Se emplean los discos comerciales impregnados de O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido. Se realiza una suspensión de 3-5 colonias en 0,3-0,5 ml de solución fisiológica. Se agrega el disco y se incuba a 35 °C durante 18-24 h. La presencia de β-galactosidasa se expresa por la liberación del O-nitrofenol, que es de color amarillo en medio alcalino.

Resultado positivo: color amarillo.

Resultado negativo: sin cambio

Control positivo: S. saprophyticus

Control negativo: S. aureus

Resistencia a novobiocina y bacitracina (Staphylococcus)

Se utilizan discos de 5 µg de novobiocina y 0,04 U de bacitracina en agar Mueller Hinton.

Inóculo: Se utiliza una suspensión bacteriana en solución fisiológica o caldo de turbiedad equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. Se hisopa la placa de agar Mueller Hinton en tres direcciones y se colocan luego los discos sobre la superficie sembrada. Incubación a 35°C durante 24 h.

Resultados (Novobiocina):

Sensibilidad: Halo de inhibición > 16 mm.

Resistencia: Halo de inhibición ≤ 16 mm.

Resultados (Bacitracina):

Sensibilidad: Presencia de halo de inhibición.

Resistencia: Ausencia de halo de inhibición.

Prueba de Voges Proskauer (VP)

Método de Coblenz (indicado para estreptococos)

Medio: Caldo MRVP distribuido a razón de 2,5 ml en tubos de ensayo.

Reactivos: A: 5% de α-naftol en alcohol etílico al 95 %.

B: 0,3 % de creatina en KOH al 40 %.

Procedimiento: Se siembra el caldo MRVP con gotas del inóculo [de un caldo tripteína de soja (TSB) o infusión cerebro corazón (BHI) incubado a 35°C durante 18-24 h].

Se incuba 18-24 h.

Se agrega 0,6 ml del reactivo A y luego 0,2 ml del B.

Se agita vigorosamente durante 5 segundos y se deja en reposo, colocando el tubo en posición inclinada y sobre un papel blanco (para lograr una máxima exposición al aire, también puede aflojarse y hasta sacarse el tapón). No tocar hasta el momento de la lectura. Esto es definitivamente importante para la detección de las reacciones débiles.

La mayoría de las reacciones positivas (producción de acetoina), aparecen dentro de los primeros 15 minutos, pero la lectura final debe hacerse al cabo de una hora.

Resultado positivo: Color rosa o rojo en la superficie o en todo el caldo.

Resultado positivo débil: Color rosa pálido en los bordes del caldo.

Control positivo y/o positivo débil: *S. aureus*

Control negativo: *Escherichia coli*

Prueba de la bacitracina (estreptococos)

Esta prueba se realiza si en la placa de agar sangre se aislaron colonias de cocos gram positivos, catalasa negativos y beta-hemolíticos.

Los estreptococos del grupo A son sensibles. El resto son resistentes aunque hay excepciones dentro de los grupos C, F, y G.

Recordar que los enterococos pueden presentar hemólisis en agar sangre humana pero no en agar sangre ovina. Igualmente, son resistentes a la bacitracina.

Método

- Efectuar estrías en tres sentidos en una placa de agar sangre con un ansa con la que previamente se tocaron colonias aisladas de un estreptococo beta-hemolítico.

- Aplicar un disco de bacitracina (0,04 U).

- Dejar incubar durante toda la noche a 37°C.

Lectura: La prueba es positiva cuando se produce una inhibición en el desarrollo del germen alrededor del disco, independientemente del tamaño del halo.

Sensibilidad a la optoquina

Se realiza cuando se aíslan colonias alfa hemolíticas.

Procedimiento

Se prepara una suspensión de una turbiedad similar a la del tubo N°0,5 de la escala de McFarland. Se hisopa una placa de agar Mueller Hinton + 5% de sangre ovina en tres direcciones con la misma. Se coloca un disco de optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreína) y se deja incubar 18-24 h en presencia de 5% de CO₂.

Reacción positiva: Presencia de un halo de inhibición mayor o igual a 14 mm (discos de 6 mm).

Reacción negativa: Halos menores o habitualmente ausencia de halo.

Diámetros de 6 a 14 mm deben ser considerados dudosos y se deben confirmar mediante la prueba de solubilidad de bilis.

Control de calidad

Streptococcus pneumoniae ATCC 33400 (reacción positiva)

*Enterococcus faecalis*_ATCC 29212 (reacción negativa).

Solubilidad en bilis o sales biliares

Procedimiento

Se prepara una suspensión muy densa con la bacteria a ensayar (4 a 6 de McFarland) en 1 ml de solución fisiológica. Se reparte 0,5 ml de esta suspensión en dos tubos. A uno de ellos se le agrega 0,5 ml de solución fisiológica (tubo control) y al otro 0,5 ml de una solución de desoxicolato de sodio al 10% (tubo de prueba). Se ponen a incubar ambos tubos a 35°C.

Resultados

Prueba positiva: Se observa que el tubo de prueba se torna transparente antes de las 2 horas de incubación, mientras que el control permanece turbio.

Prueba negativa: Se observa turbiedad equivalente en ambos tubos.

Prueba no válida: Se observa que ambos tubos se tornan transparentes (probable contaminación de los tubos con detergente, EDTA u otros productos activadores de autolisinas)

Control de calidad

Streptococcus pneumoniae ATCC 33400 (reacción positiva)

*Enterococcus faecalis*_ATCC 29212 (reacción negativa)

Crecimiento en caldo hipersalado (NaCl 6,5%)

Procedimiento

Se prepara una suspensión del microorganismo a ensayar en un caldo o solución fisiológica. Se inocula una gota de esta suspensión a cada uno de los tubos (tubo con NaCl al 6,5% y tubo control con caldo nutritivo normal). A las 18-24 h se observa la turbiedad.

Prueba positiva: Ambos tubos turbios.

Prueba negativa: Turbio sólo el tubo control.

Prueba inválida: Ninguno de los tubos presenta turbiedad.

Control de calidad

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (positiva)

Streptococcus pyogenes (negativa)

Hidrólisis del hipurato

Fundamento

La enzima (hipuricasa) desdobla al hipurato (benzoilglicina) en ácido benzoico y glicina. Con el método clásico se detecta el ácido benzoico y con el rápido, la glicina.

La prueba se puede realizar de dos maneras: con el método clásico o con el método rápido.

Método clásico

Se utiliza un caldo infusión de corazón de pH 7,4 o mejor un caldo Todd & Hewitt con hipurato de sodio al 1%. Se inocula con el microorganismo a ensayar y se incuba durante 48 horas a 37°C. Se revela con Cl_3Fe al 12% (Cl_3Fe 12g en HCl al 37% 5,4ml + H_2O 94,6ml).

Se observa la presencia de un precipitado marrón persistente por formación de un complejo coloreado del hierro con el ácido benzoico que no se disuelve por agitación durante 10 minutos.

Método rápido

Preparar una solución con 0,25 g de hipurato de sodio en 25 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración. Se agrega un inóculo denso del microorganismo a 0,5 ml de la solución. Se incuba a 35 - 37°C durante una hora, se le agregan dos gotas del revelador (ninhidrina al 3,5% en butanol-acetona 1:1), se vuelve a poner en estufa durante quince minutos exactos y se efectúa la lectura final:

Prueba negativa: Solución incolora

Prueba positiva: Solución color púrpura, por ser la glicina un aminoácido que reacciona con el reactivo de ninhidrina.

Control de calidad

Streptococcus pyogenes (negativa).

Streptococcus agalactiae (positiva).

Prueba de bilis esculina

Composición del medio:

Extracto de carne	3,00 g
Peptona.....	5,00 g
Esculina.....	1,00 g
Bilis de buey.....	40,00 g
Citrato férrico.....	0,50 g
Agar.....	15,00 g

pH: 6,6 a 25⁰C

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C. El medio se debe preparar en pico de flauta en tubos. Inocular con ansa (efectuando una estría en superficie) o con pipeta (depositando gotas de un caldo desarrollado).

- Incubar a 35°C durante 24-48 h. Descartar como negativos los tubos que permanezcan inalterados a las 72 h.

- Si se produce un color negro o castaño oscuro en la mitad o más de la superficie, la prueba se considera positiva.

- Si se produce el ennegrecimiento de menos de la mitad del tubo, la prueba es dudosa y deberá repetirse. Si no se produce ennegrecimiento, independientemente de si hubo desarrollo o no, la prueba es negativa.

Control de calidad

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (positiva)

Streptococcus agalactiae ATCC 12386 (negativa)

Pruebas de PYR (pirrolidonil-β-naftilamidasa) y LAP (leucinaminopeptidasa)

El fundamento (capítulo 1b) y el procedimiento de ambas pruebas son exactamente iguales.

Procedimiento (Prueba con discos)

Rehidratar el disco con agua destilada. Colocarlo sobre un portaobjetos. Aplicar sobre él un inóculo denso del microorganismo tomado de colonias crecidas en medio sólido durante no más de 24 horas. Incubar a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos.

Agregar una gota del reactivo revelador (p-dimetilaminocinamaldehído). Dejar actuar un minuto.

Prueba positiva: Color rojo.

Prueba negativa: Color amarillo pálido o incoloro.

PYR: Control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

Streptococcus agalactiae ATCC 12386 (negativa)

LAP: Control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

Aerococcus viridans (negativa)

Observación microscópica de la morfología de cocos en medio líquido

Procedimiento

Se inocula un tubo de caldo tioglicolato con la bacteria problema. Se lo deja 18-24 horas a 35°C. Se toma una gota y con ella se efectúa un extendido en portaobjetos que se colorea con Gram.

Resultado 1: Observación de cadenas.

Resultado 2: Observación de cocos en pares y tetradas.

Resultado 3: Sólo se observan diplococos. En este caso el resultado es incierto y se deberá repetir en otras condiciones.

Resultado 4: Observación de bacilos (se interpreta como un error en la observación inicial, una contaminación al realizar la prueba o un alargamiento de cocobacilos en esta nueva condición de crecimiento).

Sensibilidad a altos niveles de vancomicina

Procedimiento

Se toma una colonia con ansa, se hacen tres estrías superpuestas sobre una placa de agar sangre y se coloca por encima de ellas un disco de vancomicina de 30 µg. A las 18-24 horas se observa la formación o no de un halo de inhibición sobre el desarrollo de la bacteria.

Resultados

Presencia de algún halo de inhibición: *Streptococcus*, *Enterococcus*, etc.

Ausencia de halo: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* o enterococos con alto nivel de resistencia a vancomicina.

Prueba de CAMP

Procedimiento

Efectuar una estría con una cepa de *Staphylococcus aureus* productor de beta-lisina, por ej. ATCC 25923 en una placa de agar sangre ovina.

Realizar otra estría en forma perpendicular a la anterior con el estreptococo que se va a probar. No tocar la estría del estafilococo: llegar a 1 mm de la misma.

Lectura: a las 24-48 h se produce un refuerzo de la hemólisis del estafilococo quedando una zona francamente hemolizada en forma de punta de flecha (prueba positiva).

Esta prueba puede también realizarse utilizando discos de beta-lisina, pero no están disponibles comercialmente en nuestro medio.

Control de calidad:

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (negativa)

Streptococcus agalactiae ATCC 12386 (positiva)

Advertencia:

No utilizar placas de agar sangre preparadas con sangre que no sea de oveja

No utilizar otra cepa de *S. aureus* que no sea la recomendada

Almidón

Composición por litro

Agar	8g
Peptona	2g
Extracto de carne o peptona de carne N° 1	1,2g
Cloruro de sodio	2g
Almidón soluble	8g
Agua destilada	400ml
pH : 7,2 +/- 0,1	

Preparación:

1. Disolver el agar en 200ml de agua por calentamiento. **A**
2. Disolver el extracto de carne y la peptona en 150ml de agua. **B**
3. Mezclar **A** y **B** y completar los 400ml con el almidón disuelto en lo que resta de agua
4. Fraccionar en tubos de 20 ml
5. Esterilizar
6. Plaquear en el momento de su uso

No refrigerar las placas

Reactivo revelador: Alcohol yodado

Yodo	20g
Yoduro de potasio	24g
Alcohol al 50% *	1000ml

*Alcohol de 96° (600ml) + Agua destilada (450ml)

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos gram negativos

Agar Lisina-Hierro (LIA)

Fundamento

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos que la transforman en cadaverina. Esto produce un viraje al violeta del indicador de pH que en este caso es púrpura de bromocresol. Puesto que la descarboxilación solo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6,0), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo por fermentación de la glucosa. Por este motivo, este medio de cultivo solo debe utilizarse para la diferenciación de bacterias que fermenten la glucosa.

Los microorganismos que no poseen la lisina descarboxilasa, pero son fermentadores de la glucosa, producen un viraje al amarillo del medio de cultivo. La volatilización del CO₂ producido ocasiona la alcalinización en la zona de la superficie del medio de cultivo y en consecuencia, se produce un viraje al violeta. La producción de H₂S da una coloración negra al medio debida al sulfuro de hierro que se forma.

Las cepas del grupo *Proteus-Providencia-Morganella*, con excepción de algunas cepas de *Morganella morganii*, desaminan la lisina produciendo ácido alfa-cetocarbónico. Este último, con la sal

de hierro y bajo la influencia del oxígeno, forma combinaciones pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo.

Composición

Peptona de carne	5,00 g
Extracto de levadura	3,00 g
D (+) glucosa	1,00 g
Monoclorhidrato de L -lisina	10,00 g
Tiosulfato de sodio	0,04 g
Citrato de amonio y hierro (III)	0,50 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	12,50 g
Agua	csp. 1.000 ml

Incubación: 16-18h a 37°C.

Resultados

Presencia de color violeta en todo el medio: Descarboxilación de la lisina.

Presencia de color violeta en superficie y amarillo en profundidad: Negativo.

Presencia de color pardo rojizo en la superficie: Desaminación de la lisina.

Ornitina-descarboxilasa (ORN) y arginina-dihidrolasa (ADH)

Fundamento

Se prepara un caldo comercial que contiene púrpura de bromocresol como indicador de pH y al que se agrega ornitina o arginina como sustancias reaccionantes. En primer lugar, la glucosa es degradada a ácido láctico. Como consecuencia de esto, al igual que sucede con el medio LIA, el color del indicador de pH vira al amarillo (pH inferior a 5,6). Después, las bacterias que descarboxilan la ornitina o que producen la doble hidrólisis de la arginina, producen un nuevo ascenso del pH debido a la degradación de los respectivos aminoácidos. De este modo, el medio de cultivo retoma su color violeta original. Este ensayo solamente debe realizarse con microorganismos que puedan utilizar glucosa, con producción de ácido. Sin embargo hay formulaciones que permiten verificar la descarboxilación de aminoácidos por bacterias no fermentadoras de glucosa (medio de Moeller o

tabletas Rosco). El medio basal, con el agregado de lisina, también puede utilizarse para corroborar la descarboxilación de este aminoácido.

Composición del medio

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
D (+) Glucosa	1,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,016 g
Agua	csp. 1.000 ml
Esterilizar. Agregar la solución del aminoácido esterilizada por filtración en una concentración del 1 % excepto a la porción de medio que se empleará para la preparación de los tubos de control. Distribuir en tubos.	

Incubación e interpretación

Tanto el medio de cultivo completo como los tubos de control se siembran con el cultivo puro en cuestión. A continuación, los medios de cultivo se deben recubrir con vaselina estéril. Incubar hasta 4 días a 35° C.

Durante las primeras 6 a 8 h el medio es de color amarillo intenso. Si el microorganismo degrada la ornitina (o la arginina, según el caso), su color se tornará violeta. Los tubos de control deberán permanecer amarillos.

Agar triple azúcar-hierro (TSI)

El medio agar triple azúcar hierro (TSI) es un medio diferencial que se utiliza para la investigación de bacilos gram negativos aislados de materiales clínicos.

Los componentes más importantes están constituidos por peptona, tres azúcares: (glucosa al 0,1 %, lactosa al 1 % y sacarosa al 1 %), sales de hierro, tiosulfato de sodio y un indicador de pH: rojo de fenol.

Para su correcta utilización debe ser envasado en tubos de vidrio transparente y después de esterilizado se lo debe dejar solidificar en forma de pico de flauta, permitiendo que se forme una columna profunda en la parte inferior del tubo.

La siembra debe hacerse a partir de una colonia aislada de un cultivo puro, por punción en el fondo y por estría en la superficie del pico de flauta.

La lectura debe realizarse luego de 18-24 h de incubación.

Lectura e interpretación de los resultados

La degradación de los azúcares con formación de ácidos se comprueba por un viraje del indicador desde el anaranjado rojizo al amarillo.

La alcalinización del medio produce un viraje al rojo oscuro.

La producción de sulfuro de hidrógeno a partir de los componentes azufrados se manifiesta por la aparición de un precipitado negro de sulfuro de hierro, producido por la reacción del sulfuro de hidrógeno con las sales de hierro.

La aparición de cavidades y grietas en el agar se interpreta como formación de gas a partir de la fermentación de glucosa.

Los microorganismos que fermentan la glucosa pero no son capaces de degradar ni la lactosa ni la sacarosa, darán a las 18-24 h. un color amarillo en profundidad (ácido) y rojo en superficie (alcalino) (Alc/Ac). En realidad, la glucosa es degradada en toda la masa del medio. Sin embargo, debido a su baja concentración (0,1 %), en el pico de flauta alcanzará una oxidación completa y se consumirá totalmente. Es así que por cumplirse un proceso de degradación en presencia del oxígeno del aire, se forma CO₂ que se volatiliza. El microorganismo comenzará a utilizar peptonas cuyos productos metabólicos alcalinizarán el medio. Este proceso no alcanza a producirse en la parte profunda del medio en 24 h debido a la ausencia de oxígeno.

Los microorganismos que además tienen la facultad de degradar la lactosa y/o la sacarosa darán en 24 h un color totalmente amarillo (Ac/Ac), debido a la alta concentración de estos azúcares (1%). Las bacterias no fermentadoras de glucosa (no incluidas dentro de las enterobacterias) no producen cambios en el medio o aumentan su coloración rojiza (Alc/Alc).

Precauciones

Es fundamental que la lectura e interpretación de los resultados se realice dentro de las 18-24 h. Una lectura prematura puede no detectar cambios o puede dar falsos resultados Ac/Ac; una lectura demorada puede dar falsos resultados Alc/ Ac.

Es importante tener en cuenta la cantidad de medio que se envasa. Si no es suficiente como para formar una columna profunda se puede producir en 18 h una oxidación completa de la glucosa dando falsos resultados Alc/Alc en bacterias que de otro modo darían Alc/Ac.

Prueba de la oxidasa

Fundamento

La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima (oxidasa) y se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del

transporte de electrones y es el aceptor final, produciendo agua o peróxido de hidrógeno al combinarse con hidrógeno según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

Se demostró que todas las bacterias oxidasa positivas que se estudiaron eran aerobias o anaerobias facultativas.

Los microorganismos anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa porque no pueden vivir en presencia del oxígeno atmosférico y no poseen el sistema citocromooxidasa.

Si la bacteria produce oxidasa, cuando ésta se encuentra en presencia de oxígeno, citocromo y un reactivo factible de oxidar, oxidan dicho reactivo para formar un compuesto coloreado. Se sustituyen los aceptores electrónicos en cualquier sitio de la cadena de transporte, por sustratos artificiales, y este es el fundamento de la técnica de esta reacción.

Técnica

En la práctica se usan discos comerciales embebidos en una solución estabilizada de oxalato de N,N-dimetilparafenilendiamina (hay otros reactivos como opciones).

En un tubo de hemólisis, se prepara una suspensión densa del microorganismo en estudio, en aproximadamente 0,2 ml de agua destilada. Colocar un disco del reactivo: rápidamente se producirá un color rosado que se intensificará hacia el fucsia, cuando la reacción es positiva.

La reacción ocurre en forma inmediata; una reacción lenta (más de dos minutos) debe ser considerada negativa.

Si hubiera escaso número de colonias sospechosas, se humedece el disco con una gota de agua y luego se coloca sobre él una de las colonias en estudio, extendiendo con un ansa. Se observará de inmediato la pigmentación ya descrita en la zona correspondiente a la colonia transferida.

Aclaración: Deben emplearse cultivos frescos (18-24 h) y en lo posible no desarrollados en medios de cultivo con pH ácido o con hidratos de carbono utilizables (ej: glucosa), ya que su fermentación podría inhibir la actividad de la enzima y podrían obtenerse resultados falsamente negativos.

Agar citrato de Simmons

La prueba se basa en que algunas bacterias pueden obtener energía en ausencia de fermentación, empleando el citrato como única fuente de carbono. La enzima que desdobla el citrato requiere un catión bivalente para su actividad (Mg^{++} o Mn^{++}). El medio utilizado para la fermentación del citrato contiene también sales de amonio inorgánicas. Un microorganismo que es capaz de emplear citrato como única fuente de carbono, utiliza también sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblán en amoníaco con la consiguiente alcalinidad. Es así que el medio pasa de color verde a azul.

Procedimiento

Se siembra una colonia aislada de la cepa en estudio en un tubo en pico de flauta por estría en superficie.

Incubación

Se incuba durante 24 o 48 h a 35°C. Algunas veces es necesaria una incubación más prolongada (hasta 4 días).

Resultados

Se observa el viraje del indicador de pH (azul de bromotimol). A pH alcalino el indicador vira al color azul intenso (esto ocurre en el caso de que el microorganismo probado use el citrato y por ende también las sales de amonio, dando amoníaco como producto final).

El medio no inoculado tiene pH 6,9 (neutro) y es de color verde. Si el resultado de la prueba es negativo, no se observa ni crecimiento ni cambio de color del medio.

Composición del medio

Sulfato de magnesio	0,20 g
Fosfato monoamónico	1,00 g
Fosfato dipotásico	1,00 g
Citrato de sodio	2,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Agar agar	15 g
Azul de bromotimol (solución alcohólica al 1,5 %)	0,08 g
Agua destilada	csp. 1000 ml

Control de calidad

Control de esterilidad

Incubar a 37°C toda la noche. Verificar ausencia de desarrollo

Control de calidad de la prueba:

- Reacción positiva: *Klebsiella pneumoniae*.
- Reacción negativa: *Escherichia coli* ATCC 25923

BAM (Buenos Aires Modificado)

Composición

Peptona	2g
Solución acuosa al 50% de urea	2ml
Solución acuosa al 10% de lactosa	3ml
Indicador de Andrade	1,5 ml
Indicador azul de timol	0,3 ml
Agar-agar	0,3g
Agua destilada	100ml
Color final: amarillo	

Procedimiento e interpretación

La siembra se realiza por punción. Se incuba a 35°C durante 24 a 96 horas.

La utilización de la lactosa se visualiza por el viraje de los indicadores al color rojo-anaranjado. Si el microorganismo utiliza la urea el medio virará al verde o verde azulado. La movilidad se aprecia por enturbiamiento del medio alrededor de la línea de siembra.

Prueba de la fenilalanina desaminasa

Fundamento

El aminoácido aromático fenilalanina es desaminado por oxidación y se convierte en ácido fenilpirúvico. Este cetoácido (el ácido fenilpirúvico) se pone en evidencia al hacerlo reaccionar con una solución alcohólica o acuosa de cloruro férrico al 10%. El cloruro férrico con los cetoácidos actúa como quelante, dando una reacción de color. Con el ácido fenilpirúvico da color verde.

Procedimiento

Sembrar un tubo en pico de flauta, con inóculo denso a partir de la colonia aislada a probar. Se incuba a 35°C de 18 a 24 h.

Revelado: Se agregan gotas de una solución de cloruro férrico al 10% al tubo inclinado y se inclina el tubo para que se deslicen suavemente sobre el pico de flauta.

Lectura: Deberá observarse el color del medio hasta los 15 minutos de realizado el revelado. Es importante no dilatar la lectura hasta después de ese tiempo porque puede negativizarse.

Prueba positiva: formación de un color verde claro o intenso en el pico de flauta.

Prueba negativa: No se produce cambio de color, se mantiene amarillo por el color del reactivo revelador.

Precauciones

La prueba de fenilalanina debe ser interpretada inmediatamente después del agregado del reactivo tricloruro férrico porque el color verde se desvanece rápidamente. Conviene hacer que dicho reactivo se deslice sobre el pico de flauta, ya que permite obtener una reacción más rápida y con un color más pronunciado.

Composición del medio

D-L fenilalanina	2,0g
Extracto de levadura	3,0g
Cloruro de sodio	5,0g
Fosfato disódico	1,0g
Agar agar	12,0g
Agua destilada	csp. 1000 ml
pH:7,3	

Preparación

1. Pesar las cantidades exactamente siguiendo las indicaciones del prospecto.
2. Rehidratar con agua destilada
3. Calentar suavemente hasta disolución.
4. Distribuir aproximadamente 4 ml en tubos de hemólisis
5. Esterilizar en autoclave a 121° durante 15 minutos
6. Dejar que el medio se solidifique en posición oblicua (pico de flauta)
7. Conservar a 4°C

Vencimiento: 1 mes. En tubos precintados: 6 meses

Reactivo revelador

Agua destilada o desionizada	500 ml *
Ácido clorhídrico concentrado	12 ml *
Cl ₃ Fe. 6H ₂ O	60g

* No invertir el orden: primero el agua, después el ácido

Pesar el cloruro férrico, disolverlo en la mezcla de agua y ácido clorhídrico concentrado, agitando y calentando suavemente. Filtrar si es necesario.

Vencimiento: un año.

Control de calidad

- *Control de esterilidad:* Incubar a 37°C durante toda la noche
- *Control de efectividad:* *Proteus mirabilis*, prueba positiva

E. coli: prueba negativa

Prueba del Rojo de Metilo y de Voges Proskauer

Para ambas pruebas se usará el medio de Clark y Lubs (MRVP)

Composición:

Polipeptona o peptona amortiguada	7,0g
Dextrosa (glucosa)	5,0g
Fosfato dipotásico	5,0g
Agua destilada	csp. 1000 ml
pH : 6,9	

Es un medio líquido que se siembra y se incuba como mínimo durante 48 h.

Rojo de metilo

En esta prueba se determina la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

Es una prueba cualitativa de la producción de ácido de los microorganismos, ya que algunos producen más ácidos que otros.

Los microorganismos que dan negativa la prueba de rojo de metilo, inicialmente fermentan la glucosa, dando productos ácidos, pero continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación. En ese proceso producen acetilmetilcarbinol (acetoína) neutro, elevando el pH hacia la neutralidad (pH 6 o más).

Los microorganismos que dan la prueba de rojo de metilo positiva, entre los 2 y 5 días siguen produciendo ácidos fijos o estables y dan como resultado un pH terminal bajo, venciendo al *buffer* y manteniendo un medio ácido (pH $\leq 4,2$).

Los microorganismos en estudio, se incubarán entonces por lo menos dos días a 35-37°C para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa.

Al medio de Clark y Lubs incubado (aproximadamente 2,5 ml), se le agregan unas 5 gotas del revelador de rojo de metilo [solución de rojo de metilo (0,1 g en 300 ml de etanol de 95°), en 200 ml de agua destilada].

Resultados:

El color debe observarse inmediatamente.

Prueba positiva (pH ácido): el color se mantiene rojo (pH de 4,4 a 6)

Prueba negativa [pH más alto (pH 6)]: viraje del indicador al amarillo.

Prueba dudosa (pH de 5 a 5,8): color naranja (se repite incubando hasta 4 días)

Voges-Proskauer

Esta prueba determina la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir de la fermentación de la glucosa.

Este producto final se pone en evidencia con dos reactivos: A y B.

Reactivo A	
α -naftol	5,0 g
Etanol absoluto	csp. 1000 ml
Reactivo B	
KOH	40,0 g
Agua destilada	csp. 1000 ml

Técnica

A un tubo de medio de Clark y Lubs (aproximadamente 2,5 ml), previamente inoculado e incubado, se le agrega 0,6 ml de reactivo A (solución alcohólica de α -naftol) y 0,2 ml de reactivo B (actúa como oxidante). Se agita el tubo suavemente, para exponer el medio al oxígeno a fin de oxidar la acetoína y obtener una reacción de color.

Dejar descansar el tubo por lo menos durante 10 a 15 minutos antes de interpretar el color.

Es importante agregar los reactivos en el orden correcto. El reactivo A actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin pérdida de su especificidad.

El hidróxido de potasio reacciona con la acetoína, oxidándola y dando como producto final un complejo color rosado a rojo que es estable en la fase alcohólica por acción del α -naftol.

Por lo general, se produce una reacción positiva entre los 2 a 5 minutos, mostrando un débil color rosado. No obstante después de descansar 30 minutos se observa una coloración roja más intensa.

Resultados

Reacción positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína).

Reacción negativa: color amarillo en superficie del medio (el mismo color del reactivo).

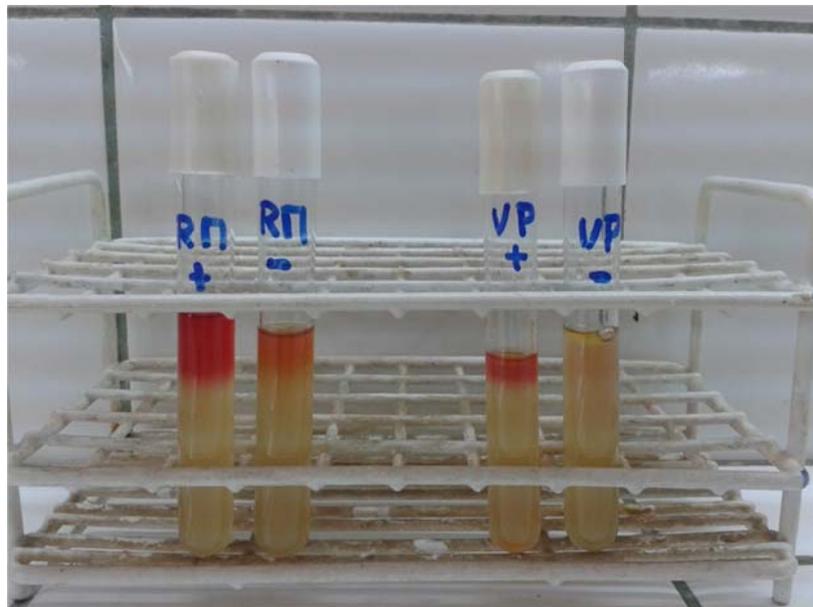


Figura 1. Pruebas de rojo de metilo (izquierda) y Voges Proskauer (derecha)

Agar acetato

Medio desarrollado para verificar la capacidad de ciertos microorganismos de utilizar acetato como única fuente de carbono.

Composición en gramos por litro

Acetato de sodio	2,0
Sulfato de magnesio	0,1
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato monoamónico	1,0
Fosfato dipotásico	1,0
Azul de bromotimol	0,08
Agar	20,0
pH:6,8+/-0,2	

Preparación

- Pesar las cantidades exactamente siguiendo las indicaciones del prospecto

[Acetate differential agar (Difco): 8,8g]

- Rehidratar con 300 ml de agua destilada
- Calentar suavemente hasta disolución
- Distribuir aproximadamente 3 ml por tubo de hemólisis
- Esterilización en autoclave 121° durante 15 minutos
- Dejar que el medio se solidifique en pico de flauta

El medio preparado es de color verde

Interpretación de los resultados

Reacción positiva: viraje a azul del medio.

Reacción negativa: el medio permanece sin cambios.

Control de calidad

Control de esterilidad: Incubar a 37°C durante toda la noche. Verificar ausencia de desarrollo.

Control de desarrollo

Control positivo: *Escherichia coli* ATCC25922: buen crecimiento y viraje a azul.

Control negativo: *Shigella* sp: ausencia de crecimiento y no viraje del indicador. Permanece de color verde

Medio SIM (ácido sulfhídrico-indol-movilidad)

Es un medio diferencial (multiprueba), que posee tiosulfato de sodio como fuente de azufre y sulfato ferroso como indicador de la producción de H₂S (ennegrecimiento del medio). Además el medio contiene peptonas para estudiar la producción de indol, el cual se revela por agregado de gotas de reactivo de Ehrlich o de Kovacs, luego de su incubación. También, por tratarse de un agar blando, se puede poner en evidencia la movilidad del microorganismo en estudio, observando por luz transmitida la migración bacteriana por fuera de la línea de punción.

Composición

Triptona.	20,0g
Peptona	6,1g
Sulfato ferroso	0,2g
Tiosulfato de sodio	0,2g
Agar	3,5g
Agua	csp. 1000ml

Siembra: se realiza por punción con ansa recta, y se incuba 24-48 h a 35- 37° C.

Composición del Reactivo de Ehrlich

p-dimetilamino benzaldehído	2g
Alcohol etílico (absoluto)	190 ml
Ácido clorhídrico concentrado	40 ml

Composición del Reactivo de Kovacs

p-dimetilamino benzaldehído	10g
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
Ácido clorhídrico concentrado	50 ml

El indol se forma por oxidación del aminoácido triptofano, presente en las peptonas.

Resultados

Después del revelado con alguno de los reactivos mencionados, los resultados son los siguientes:

Prueba positiva: Anillo rojo del complejo formado entre el indol y el aldehído del reactivo que se ve en la fase alcohólica, en la superficie del medio.

Prueba negativa: Incoloro o color amarillo del reactivo, en la capa alcohólica.

Prueba con resultado dudoso: Color naranja en superficie del medio, probablemente debido a la producción de escatol, compuesto que puede ser precursor en la formación del indol.

Los autores

Dr. Horacio A. Lopardo

*Profesor Consulto de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Consultor Honorario del Servicio de Microbiología
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires
Coordinador General del Programa del Laboratorio de Salud Pública
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata*

Lic. Lidia M. Gobet

*Jefe de Trabajos Prácticos de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Bioquímica del Laboratorio del Sanatorio Argentino de La Plata*

Bioq. José A. Viegas Caetano

*Ayudante Diplomado de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Ex Bioquímico del Laboratorio de Bacteriología, HIGA Gral. San Martín, La Plata*

Bioq. Ana María de los Angeles Moviglia

*Ayudante Diplomado de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata*

Bioq. Laura Vigliarolo

*Ayudante Diplomado de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Subjefe del Laboratorio del Hospital Interzonal General de Agudos "San Roque", Gonnet*

Bioq. Mariana Suárez

*Ayudante Diplomado de Microbiología Clínica de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Bioquímica de Guardia del Hospital Interzonal General de Agudos "San Roque", Gonnet*

Introducción a la microbiología clínica / Horacio Lopardo ... [et al.] ;
coordinación general de Horacio Lopardo. - 1a ed adaptada. - La
Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2016.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-34-1313-5

1. Microbiología. I. Lopardo, Horacio II. Lopardo, Horacio, coord.
CDD 616.001

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edupl integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2016
ISBN 978-950-34-1313-5
© 2016 - Edulp

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA