



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Facultad de Química Farmacéutica Biológica

MANUAL DE LABORATORIO DE Microbiología Médica

Elaborado por:

Mta. JUANA RAMIREZ AGUILERA

Mta. IRMA USCANGA GARCIA

Xalapa de Enríquez, Ver., Enero 2020.

PROLOGO

En México y en los países denominados del 3er. Mundo, la mortalidad por enfermedades infecciosas alcanzan cifras alarmantes, comparables a las que presentaban los países desarrollados a fines del siglo XIX y principios de este.

Los agentes etiológicos son bacterias, virus, parásitos y hongos, y aunque todos ellos muy importantes, son sin embargo las bacterias, virus y hongos los causantes del mayor número de plagas que han diezmado a la humanidad, tanto en pandemias, epidemias como en enfermedades establecidas en forma endémica. La especificidad de los diagnósticos clínico y radiológico es difícil y es el microbiológico el que generalmente lo determina con precisión.

Lo anterior habla de por sí, de la necesidad de contar con el profesional especializado en manejar eficiente y eficazmente este diagnóstico, es decir el Químico Farmacéutico Biólogo. La Facultad de Q.F.B. prepara a estos profesionales cuyo título es Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo, los cuales cursan la materia denominada Microbiología Médica. El curriculum de ésta tiene un programa amplio sobre el tema, que considera prácticamente todas los microorganismos de interés médico.

Identificar este extenso y variado número de microorganismos, resulta complicado y difícil sin contar con las técnicas: metódicas, específicas y accesibles. Este conjunto de características deben estar al alcance de los estudiantes.

El Manual se ha diseñado, siguiendo el orden sistemático del programa de la experiencia educativa del laboratorio de Microbiología Médica. Es de esperar que este material llenara la demanda de los jóvenes en formación y aún, que será de gran utilidad a los egresados, y a todos aquellos que se dedican al diagnóstico microbiológico.

Introduccion

El presente Manual constituye una guía para que el alumno conozca los elementos temáticos en que se sustenta el curso de Laboratorio de Microbiología Médica, aprecie la profundidad y los alcances del conocimiento que ira adquiriendo a lo largo del periodo escolar.

La Microbiología Médica es una de las disciplinas que más ha apoyado el área diagnóstico en los últimos tiempos. La cantidad de información que se publica diariamente, se puede decir sin exagerar, se está incrementando en forma vertiginosa. Ahora no existe especialidad o actividad médica en la que la participación de bacteriología no esté presente; de ahí la importancia de seguir incorporando el estudio del laboratorio de Microbiología Médica como una materia formal en el plan de estudios de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

En este Manual se ha añadido una breve introducción a cada tema, con el propósito de que el alumno tenga una visión general del panorama que ofrece cada uno de los temas, sin tener la pretensión, puesto que no es la idea, de ofrecer un texto de consulta.

Este Manual incluye un apéndice el cual esta constituido por técnicas representativas de algunos medios de cultivo.

Unidad de competencia

El estudiante es capaz de aplicar los conocimientos y metodologías actuales de la Microbiología Médica para diagnosticar las enfermedades infecciosas causadas por hongos, bacterias y virus en México. Manteniendo una postura responsable, disciplinada y crítica en cuanto a los aspectos bioéticos y de legislación vigente en México.

Estrategia metodologicas

| Estrategias de enseñanza | Estrategias de aprendizaje |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">◆ Evaluación diagnóstica◆ Búsqueda de información sobre los temas en libros y revistas impresos y electrónicos en español e ingles.◆ Discusión en pequeños grupos y en sesión plenaria.◆ Realización de prácticas de laboratorio◆ Elaboración de reportes escrito de cada practica. | <ul style="list-style-type: none">◆ Pintarrón◆ Infocus◆ Computadora portátil◆ Material, equipo y reactivos de laboratorio especificados en el manual. |

Apoyos educativos

| Materiales didácticos | Recursos didácticos |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">◆ Presentaciones en Power Point◆ Fotocopias◆ Libros y revistas impresa y electrónicas en español e ingles.◆ Manual de prácticas. | <ul style="list-style-type: none">◆ Pintarrón◆ Infocus◆ Computadora portátil◆ Material, equipo y reactivos de laboratorio especificados en el manual. |

Evaluación del desempeño

| Técnicas | Criterios | Porcentaje |
|--|--|------------------------|
| Examen Escrito | Exploratorio (Nivel de conocimientos) | 0.0 |
| Guías de Observación Lista de cotejo | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Puntualidad ➤ Cumplir con el 100% de las Prácticas de acuerdo al programa. Habilidades de ejecución en el manejo del equipo de laboratorio. Habilidades de ejecución en el desarrollo de los procedimientos de laboratorio. ➤ Actitudinal personal comportamiento en el laboratorio (responsable, comprometido, Optimista, atento, honesto) ➤ Actitudinal en equipo (colaborativo, participativo, tolerante, respetuoso etc.) | 25.0 5.0 5.0 |
| Bitácoras personales | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Entrega oportuna ➤ Presentación en letra de molde. ➤ Redacción clara ➤ Coherencia | 5.0 |
| Reporte de práctica * * La entrega es individual; excepto los resultados, la información no debe ser igual entre los estudiantes. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Presentación y limpieza del reporte ➤ Contenido (que cumpla con los elementos establecidos para cada reporte) ➤ Redacción, claridad, ortografía, comentarios personales, análisis y conclusión. ➤ Creatividad, originalidad. ➤ Resultados, interpretación. ➤ Entrega oportuna. | 20.0 |
| Examen escrito | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Dominio de los temas tratados en el laboratorio *Debiendo aprobarlos (mínimo 24%) | 20.0 20.0 |
| Total 100% | | |

Acreditación

100% de asistencia al curso de laboratorio.

Calificación mínima aprobatoria de 6

Entregar el 100% de los reportes de las prácticas de laboratorio solicitados.

Entregar al menos el 80% de las bitácoras personales.

Presentar dos exámenes escritos.

Ponderar la calificación con el curso teórico de esta experiencia educativa, en donde el 60 % equivale a la teoría y el 40 % al laboratorio.

De acuerdo a lo anterior el porcentaje mínimo para aprobar el laboratorio es 24 %

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA.

1. No se permitirá la entrada al laboratorio al alumno que llegue 15 minutos después de la hora de entrada.
2. No se permitirá la entrada al laboratorio a ningún alumno si no trae puesta y abrochada debidamente la bata.
3. Todos los objetos personales deberán ser guardados en sus gavetas de las mesas de trabajo.
4. El alumno deberá estar provisto del material personal asignado o de lo contrario no podrá permanecer en el laboratorio.
5. Queda **ESTRICTAMENTE PROHIBIDO** comer, beber, fumar y en general, llevarse cosas a la boca dentro del laboratorio.
6. Debe evitarse entablar conversaciones, así como comunicarse a voces con los vecinos de otras mesas.
7. Todo el material no contaminado tal como: algodón, papeles, cerillos, etc., deben ser depositados en los botes de basura destinados para este uso. No se debe tirar basura al suelo ni guardarla en los cajones, ni tirarla en los vertederos.
8. Debe limpiarse con solución de fenol o benzal, la mesa de trabajo **ANTES** de empezar y al **TERMINAR** la práctica.
9. En caso de romper o derramar material contaminado debe verterse fenol o benzal sobre él y déjelo cuando menos 10 minutos antes de limpiar. **AVISE AL PROFESOR.**
10. El material que se rompa o extravíe debe ser pagado en la siguiente práctica en el cubículo de preparadores.
11. Incubar el material el tiempo que se indique, en caso contrario, éste será desechado.
12. No almacenar material en el refrigerador.
13. Al finalizar cada práctica, guardar el material empleado debidamente separado: material sucio para esterilizar, quitarle las etiquetas; material sucio para lavar, colocarlo en otro sitio; reactivos debidamente ordenados y cerrados.
14. Los bancos deben dejarse en su sitio.
15. Los informes de las prácticas deberán ser revisados por el profesor y ayudarán a mejorar o a bajar la calificación al final del curso.
16. Colocar los microscopios limpios (sobretudo la lente de inmersión en su lugar correspondiente). Informar al Profesor si observa alguna descompostura o desajuste.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO PARA EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

INCUBADORA

REFRIGERADOR

BAÑOS MARIA ELECTRICO

HORNO DE SECADO

AUTOCLAVE

MICROSCOPIO COMPUESTO

MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

CONTADOR DE COLONIAS

BALANZA ANALITICA

BALANZA GRANATARIA

PARRILLA DE CALENTAMIENTO

AGUA

GAS

ASA DE PLATINO

GUANTES DE ASBESTO

MECHERO

MATRACES E.M. 1000, 500, 250

TUBOS DE ENSAYO DE 13X100 CON TAPON DE ROSCA

TUBOS DE ENSAYO DE 15X150 CON TAPON DE ROSCA

PIPETAS DE 10, 5, 1 ml

CAJAS PETRI DESECHABLES UNA Y DOS Y TRES DIVISIONES

PORTA OBJETOS

CUBREOBJETOS

GRADILLA

JERINGA DE 10 ml

LIGADURA

ALCOHOL

DESINFECTANTE

BENZAL

INDICE

| | |
|--|----|
| UNIDAD I ASPECTOS ADMINISTRATIVOS Y LEGISLATIVOS RELACIONADOS CON EL LABORATORIO CLÍNICO | 11 |
| UNIDAD II ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA DE HONGOS. | 12 |
| PRÁCTICA NO.1. Examen macroscopico y microscopico de hongos ambientales. | 12 |
| - Prueba de KOH al 10%,..... | 12 |
| - Tinción Lactofenol Azul de Algodón | 13 |
| - Blanco de Calcoflúor | 14 |
| UNIDAD III. INFECCIONES DE LAS VIAS RESPIRATORIAS SUPERIORES | 15 |
| PRÁCTICA NO. 2 Cultivo de Exudado Faríngeo..... | 16 |
| PRÁCTICA No. 3 Detección directa de antígenos microbianos. | 18 |
| (Antiestreptolisina O) | 18 |
| PRÁCTICA NO. 4. Prueba rápida inmunocromatográfica de un solo paso para la determinación cualitativa del virus de Influenza Tipo A & B, en muestras de fluido nasal, de garganta, nasofaríngeo o aspirado..... | 20 |
| Practica No. 5 Cultivo de Exudado Otico | 22 |
| Unidad IV Infecciones del ojo | 25 |
| PRACTICA No. 6 “Cultivo de Exudado Conjuntival” | 26 |
| PRÁCTICA NO. 7. Determinación de <i>Chlamydia trachomatis</i> | 28 |
| Unidad V Infecciones de las vias respiratorias inferiores | 33 |
| PRÁCTICA NO. 8. Cultivo de expectoración | 34 |
| PRACTICA No. 9. Mycoplasma pneumoniae. | 36 |
| Unidad VI. INFECCIONES DE LAS VÍAS URINARIAS | 42 |
| PRACTICA No. 10 Urocultivo | 42 |
| Unidad VII ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL | 46 |
| Práctica No. 11 y 12 “Cultivo de Exudado Cervico-Vaginal y Exudado Uretral” | 47 |
| Unidad VIII. INFECCIONES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL | 53 |
| Práctica No. 13. Coprocultivo | 53 |
| PRÁCTICA NO. 14 | 56 |
| Determinación de Helicobacter pylori (Método de ELISA) | 56 |
| Unidad IX INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL..... | 61 |
| PRÁCTICA NO. 15. Cultivo de líquido cefalorraquídeo | 61 |
| Unidad X sistema hematopoyetico..... | 65 |
| PRÁCTICA No. 16. Hemocultivo | 66 |
| UNIDAD X1. INFECCIONES DE LA PIEL: POR HERIDAS Y MULTISISTEMICAS | 70 |
| PRÁCTICA NO. 17. Cultivo de heridas. | 70 |

| | |
|--|-----------|
| BIBLIOGRAFIA..... | 77 |
| ANEXO A. Técnicas de Tinción..... | 78 |
| 1 Tinción de Gram | 79 |
| 2 Tinción de Zielh Neelsen | 80 |
| 3 Tinción Negativa. Método de Gin. | 81 |
| 4 Método de Hiss | 78 |
| 5 Método de Schaeffer – Fulton | 79 |
| ANEXO B: Medios de Cultivos..... | 78 |

UNIDAD I ASPECTOS ADMINISTRATIVOS Y LEGISLATIVOS RELACIONADOS CON EL LABORATORIO CLÍNICO

OBJETIVO:

Que el alumno ponga en práctica las principales medidas de seguridad que se requieren en un laboratorio de bacteriología así como el manejo adecuado de los residuos biológicos infecciosos, de acuerdo a la normatividad vigente, desarrollando actitudes de compromiso con la preservación de la salud y del medio ambiente.

1. NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
2. Revisar e investigar la normatividad NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
3. Construcción de un manual de medidas de seguridad.

UNIDAD II ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA DE HONGOS.

PRÁCTICA NO. 1. Examen macroscopico y microscopico de hongos ambientales.

OBJETIVO:

Que el alumno adquiera habilidad en la realización de los principales métodos de tinción, que se utilizan para identificar la morfología y fisiología de los hongos.

MATERIAL:

Porta objetos
Cubreobjetos
Asa de platino
Equipo de tinción KOH al 10%
Tinción Lactofenol Azul de Algodón
Muestra ambientales de tomate, tortilla, pan u otros alimentos en descomposición.
Cepas de *Aspergillus* y *Candida*.
Equipo de protección (Cubre bocas, guantes, bata).

- *Prueba de KOH al 10%*,

| | |
|---------------------------------|-------|
| Hidroxido de potasio, cristales | 10 g |
| Glicerol | 20 ml |
| Agua destilada | 80 ml |

De mayor utilidad en observacion de escamas, pelo y uñas, para aclarar la queratina.

Tecnica

- a) Colocar una gota de solución KOH 10%, en un portaobjetos.
- b) Con un aplicador (o con unas pinzas si se trata de un hongo) colocar la muestra.
- d) Hacer una suspensión uniforme.
- c) Se deja reposar 20 min o se calienta suavemente.
- e) Colocar un cubreobjetos y hacer la observación microscópica inmediatamente con los objetivos 10X y 40X.

Las estructuras fúngicas, se observan birrefringentes.

- Tinción Lactofenol Azul de Algodón

| | |
|--------------------|-------|
| Cristales de fenol | 20 gr |
| Acido lactico | 20 ml |
| Glicerina | 40 ml |
| Agua destilada | 20 ml |
| Azul algodón | |
| solución acuosa 1% | 2 ml |

Preparación:

Disolver el fenol en el agua.

Agregar el ácido y la glicerina.

Calentar a 70 °C.

Adicionar el colorante.

Guardar en frasco de vidrio.

- El azul algodón se fija a la quitina de los hongos

- Se puede hacer una preparación permanente

Se realizan las preparaciones a partir de cultivos. El fenol destruye la flora acompañante y organismos; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Añadimos una gota de la muestra o una porción del hongo en un porta. Sobre ella colocamos una gota de azul algodón y ponemos el cubre. Observamos al microscopio.

- Blanco de Calcoflúor

Las paredes celulares de los hongos fijan el colorante blanco de calcoflúor aumentando considerablemente su visibilidad en los tejidos y otras muestras. Según fue descrito por Hageage y Harrington, este colorante se emplea en lugar de KOH al 10% para el examen inicial de los materiales clínicos. También se emplea para aumentar la visualización de los elementos morfológicos de los cultivos puros de los hongos. En algunos laboratorios ha suplantado al azul de lactofenol en muchas aplicaciones. Los organismos fluorescen con luz blanco-azulada o verde manzana, según la fuente luminosa que se utilice.

Se realiza un examen directo sea cual sea la muestra. Es útil en cortes de tejidos.

Colocamos en un porta la muestra + 1 gota de KOH dimetil sulfóxido + 1gota de calcofluor. Mezclamos y ponemos el cubre. Después de varios minutos se ha producido la clarificación, y se observa en un microscopio de fluorescencia (verde brillante o blanco azulado). Las fibras elásticas y colágeno se observan con fluorescencia amarillo verdosa. Estas se pueden confundir con hongos y levaduras y se diferencian en la fluorescencia.

Hay algunos hongos (“hongos dematiaceos”) que producen enfermedades como micetomas que se tiñen con gran dificultad usando el blanco de calcofluor.

UNIDAD III. INFECCIONES DE LAS VIAS RESPIRATORIAS SUPERIORES

Existen muchas infecciones de las vías respiratorias altas que requieren el cuidado clínico de un médico o de otro profesional del cuidado para la salud. La faringitis y la amigdalitis son infecciones de la garganta que causan inflamación. Si afecta principalmente a las amígdalas, se denomina amigdalitis. Si afecta principalmente a la garganta, se denomina faringitis.

Existen muchas causas de las infecciones de la garganta. Algunas de ellas son las siguientes: Las bacterias; Estreptococos beta-hemolíticos del grupo A (su sigla en inglés es GABHS), *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* del tipo B, *Mycoplasma*.

En la mayoría de los casos, resulta difícil distinguir entre una infección vírica y una infección por estreptococos sólo con el examen físico. Sin embargo, es importante saber si la infección de garganta es debida al GABHS, ya que en este caso es necesario un tratamiento con antibióticos para evitar las complicaciones que puede producir dicha bacteria.

Se pueden realizar los llamados "quick test" que detectan rápidamente los estreptococos. Si el resultado es positivo, se pueden empezar a tomar inmediatamente antibióticos contra el GABHS. Si es negativo, parte de la muestra de la garganta se utilizará para realizar un cultivo de faringe. El cultivo identificará, a los dos o tres días, si el GABHS está presente. Su médico decidirá el plan del tratamiento dependiendo de los resultados.

PRÁCTICA No. 2 Cultivo de Exudado Faríngeo

OBJETIVO:

El alumno analizará la flora normal y patógena de las vías respiratorias altas a partir de una muestra de exudado faríngeo.

FUNDAMENTO:

El análisis del exudado faríngeo se basa en la diferenciación entre las bacterias patógenas y flora normal de las vías respiratorias del individuo, apoyándose en medios de cultivo selectivos y de enriquecimiento, así como en el análisis microscópico de las colonias.

GENERALIDADES:

El estudio de exudado faríngeo y nasofaríngeo es importante para el diagnóstico de ciertas infecciones, entre ellas están las estreptocócicas, la difteria, la tosferina y la candidiasis; así como para establecer el foco de infecciones de enfermedades como: fiebre escarlatina, fiebre reumática y glomerulonefritis hemorrágica aguda y en la detección de portadores de *Streptococcus b-hemolíticos*, *Neisseria meningitidis* o *Corynebacterium diphtheriae*.

Entre los patógenos se encuentran: *Streptococcus b-hemolíticos* del grupo A y ocasionalmente de los grupos B, C, y G; *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae capsulado*, *Mycobacterium tuberculosis*, y otras especies de *Mycobacterium*, *Cándida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, rara vez, *Borrelia Vicentii*, *Fusobacterium Fusiforme*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*.

En ésta práctica destaca la importancia que tiene el estudio de *Streptococcus pyogenes* en encuestas epidemiológicas para prevenir la fiebre reumática y la glomerulonefritis, en cuyo caso se debe tipificar tanto el grupo como los tipos M y T ya sea por precipitación en capilar, o inmunodifusión, o bien, por aglutinación en placa o factor de opacidad.

MATERIAL:

Cajas Petri con Agar sangre.
Cajas Petri con Vogel Johnson.
Cajas petri con Agar Chocolate.
Cajas Petri con medio EMB
Agar Biggy
Agar Dextrosa Sabouraud
Discos de Bacitracina.
1 Caldo Todd Hewitt.
1 Matraz con solución salina estéril.
Hisopos estériles de alambre frágil o madera.
Equipo para tinción de Gram.
Puente de coloración.
Frasco con benzal.

TECNICA:

OBTENCION DE LA MUESTRA:

1.- *Exudado faringeo.*- por medio de un abatelengua exponer los órganos orofaríngeos y con hisopo estéril raspar ligeramente las amígdalas y faringe, escogiendo preferentemente las zonas inflamadas o membranosas, con movimientos semi circulares de derecha a izquierda.
2.- *Exudado nasofaríngeo.*- Con un hisopo esteril a través de las fosas nasales, tocar la pared posterior de la nasofaringe haciendo girar el hisopo. La muestra se toma con dos hisopos: uno sirve para hacer dos frotis, el otro debe introducirse en caldo de Todd Hewitt para resiembra.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Resembrar a partir del caldo de Todd Hewitt (previamente incubado de 4 – 8 hrs) en cajas de agar sangre, sembrar directamente con el hisopo en agar Chocolate, agar EMB, agar Vogel Johnson, ADS, Agar Biggy por el metodo de aislamiento excepto en los dos últimos.
- 2.- Teñir el frotis con Gram.
- 3.- Incubar las cajas a 37°C durante 24-48 hrs AS, AEMB, AVJ, ADS, EN AEROBIOSIS, AGAR chocolate en sistema de Gaspak de CO2 y a Temperatura amb., el agar de biggy.
- 4.- Teñir un frotis con Gram y otro con Zielh Neelsen.
- 5.- Después de la incubación, leer morfología colonial y microscópica e identificar con pruebas bioquímicas o serología. Si se aísla un microorganismo patógeno, se debe hacer sensibilidad a los antibióticos.
- 6.- Si se interesa identificar *Streptococos b-hemolíticos* del grupo A en forma rápida, se puede utilizar la inmunofluorescencia como sigue:

a) Se descarga el hisopo con el exudado en 1 ml de caldo Todd Hewitt, incubar a 37°C durante 2 horas.

- b) Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. lavar una vez con solución salina estéril. Centrifugar nuevamente. Separar el sobrenadante mezclar perfectamente el paquete celular con la solución salina residual durante 2 o 3 mino
- e) Se hace 1 o 2 frotis con cubre objetos nuevos, dejar secar a temperatura ambiente, fijar con alcohol etílico de 96°C dejar evaporar.
- d) Cubrir el frotis con suero antiestreptococo grupo A fluorescente.
- e) Dejar reaccionar por 30 min, a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- t) Lavar dos veces sin solución salina en vasos Koplín en agitación durante 10 min.
- g) Observar en un microscopio para fluorescencia y conservar los frotis en refrigeración. Cadenas de cocos de color verde amarillento en la periferia celular y en el centro sin color indica una prueba positiva..

7. - En menores de dos años, investigue la presencia de *Haemophilus influenzae*.

8.- En caso de aislar otros microorganismos seguir instrucciones de acuerdo con la morfología microscópica que presente.

BIBLIOGRAFIA

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsvier, 2009.

PRÁCTICA No. 3 Detección directa de antígenos microbianos.

(Antiestreptolisina O)

**ANTIESTREPTOLISINA. O.
Test de aglutinación en porta.**

Guardar a 2-8°C. Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENT

O El método se fundamenta en una reacción de aglutinación de una suspensión de partículas de látex poliestireno sensibilizadas con estreptolisina O estabilizada. La aglutinación es visible en una concentración de ASO en suero igual o superior a 200 UI/mL

REACTIVOS

| | |
|--|--|
| Reactivo 1 | Látex ASO en suspensión. |
| Tapón blanco | Contiene azida sódica 0.1 %. |
| Reactivo 2 | Control positivo *. Concentración superior a 200 UI/mL |
| Tapón rojo | Suero humano. Contiene azida sódica 0.1 %. |
| Reactivo 3 | Control negativo *. Concentración inferior a 200 UI/mL |
| Tapón azul | Suero humano. Contiene azida sódica 0.1 %. |
| * Los controles son sueros humanos. Aunque no se ha detectado la presencia de antígeno HBs, ni anticuerpos anti-HIV, deben ser manipulados con la misma precaución que un suero muestra. | |

PREPARACION Y ESTABILIDAD

El reactivo 1 es una suspensión de partículas de látex, debe homogeneizarse, con una suave agitación, antes de ser utilizado. Los goteados dispensan una gota de volumen aproximado de 50 µL que es el idóneo para una buena sensibilidad. Los reactivos se deben conservar a 2-8°C, no deben congelarse. En estas condiciones los componentes mantendrán su funcionalidad hasta la fecha de expiración señalada en la etiqueta

MUESTRA

Utilizar suero. Los sueros, conservados a 2-8°C, mantienen su actividad durante 2 días.

No utilizar sueros hemolizados. No utilizar sueros altamente lipémicos pues podrían dar una aglutinación no específica.

TECNICA

Método cualitativo

1.-Atemperar el reactivo y los controles a temperatura ambiente.

2.-Homogeneizar el reactivo 1 ASO-látex, con agitación suave.

3.- Comprobar la funcionalidad del reactivo mediante los controles positivo y negativo (ver procedimiento a continuación).

4.-Dosificar 50 µL (1 gota) de suero muestra a analizar en un círculo del porta, SIN DILUIR.

5.-Añadir, aliado de la anterior, una gota de R1 ASO-látex

5.-Mezclar las dos gotas mediante agitación y extenderlas por todo el círculo.

7.-Colocar el porta en el agitador rotatorio (80-100 RPM) Y observar la aparición o ausencia de aglutinación exactamente al cabo de 2 minutos. El exceso del tiempo de reacción podría dar lugar a falsos resultados.

Método semicuantitativo:

Siguiendo la metodología cualitativa, se procederá con diluciones del suero muestra con solución salina (NaCl 9 g/L)

| Diluciones | 1/2 | 1/4 | 1/8 | ... |
|---|----------|----------|-----------|-----|
| Suero muestra | 1 00 /IL | -- | -- | |
| Sol.salina | 100 /IL | 1 00 /IL | 100 /IL | |
| | | 100 /IL | -->100/IL | |
| Dosificar en porta | 50 /IL | 50 /IL | 50 /IL | |
| Concentración si es la última dilución que da aglutinación: | | | | |
| 200 x nQ dilución | 200x2 | 200x4 | 200x8 | |
| UVmL | 400 | 800 | 1600 | ... |

INTERPRETACION.:

-La presencia de aglutinación indica un nivel de ASO igual o superior a 200 UI/mL en la muestra.

-La ausencia de aglutinación indica un nivel de ASO inferior a 200 UI/mL en la muestra.

V A LORES NORMALES

Adultos < 200 UI/mL

Los valores superiores a 200 UI/mL se encuentran en pacientes con recientes enfermedades debidas a *Streptococcus* del grupo A, B-hemolíticos.

Bibliografía

Normausell, D. *Immunochemistry* 9, (1972).
Assimeh, S.N., Johnson, P.M. *J.Immunol. Methods* 34,(1980).
Badin, J. and Barillec, A. *J.Lab. Clin. Med.* 75,(1970).
Adams, L.E., Hesa, E.J. *Amer. Tec!Jpol.* 48,(1978).

PRÁCTICA NO. 4. Prueba rápida inmunocromatográfica de un solo paso para la determinación cualitativa del virus de Influenza Tipo A & B, en muestras de fluido nasal, de garganta, nasofaríngeo o aspirado

Influenza A+B

Detección cualitativa de antígenos de Influenza tipo A y B a partir de muestras nasofaríngeas y de garganta
ONE STEP

| |
|--|
| COD CT45301 |
| 20 Test |
| Sólo para uso profesional de diagnóstico <i>in vitro</i> |

FUNDAMENTO

Influenza A+B Device es un test inmunocromatográfico para la detección cualitativa de antígenos de Influenza tipo A (incluyendo los subtipos A/H1N1 y A/H3N2) y tipo B en muestras nasofaríngeas de humanos utilizado para el diagnóstico de la infección por virus Influenza.

En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a antígenos Influenza tipo A y B. Durante el proceso, la muestra reacciona con partículas que presentan en su superficie anticuerpos anti-Influenza, formando un conjugado. La mezcla migra hacia la parte de arriba de la membrana por acción capilar. En el caso de que se de un resultado positivo los anticuerpos específicos presentes en la membrana reaccionarán con la mezcla de conjugados y aparecerán una (A/B) o dos (A y B) líneas coloreadas. Una línea verde siempre debe verse en la zona de línea de control ya que sirve como verificación de que el volumen de muestra añadido es suficiente, que el flujo ha sido el adecuado y también como control interno de los reactivos.

CONTENIDO

| | | | |
|-----|----------|----------------------|--------------------|
| REF | CT 45301 | 20 cassettes | 1 Diluyente B |
| | | 20 Hisopos estériles | 20 Tubos de ensayo |
| | | Control positivo | |

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacenar a 2-30°C.

El dispositivo de ensayo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se mantenga en el sobre bien sellado hasta su uso. **NO CONGELAR.** No usar una vez superada la fecha de caducidad. No utilizar el test si el envase se encuentra dañado. La prueba deberá realizarse durante las dos horas posteriores a la apertura del envase.

MUESTRAS Y PREPARACION

Hisopo nasofaríngeo:

- Doblar el hisopo ligeramente para introducirlo en la cavidad nasofaríngea.
- Introducirlo a través del orificio hacia la nasofaringe posterior.
- Rotar el hisopo varias veces para obtener células infectadas.
- Para una correcta toma de muestras repetir el procedimiento con el otro orificio nasal.

Aspirado nasofaríngeo

(aparato de succión, catéter estéril de succión):

- Instilar varias gotas de solución salina dentro de cada orificio.
- Colocar el catéter atravesando el orificio hacia la nasofaringe (misma distancia hacia el oído).
- Aplicar una ligera succión. Realizando un movimiento rotatorio, extraer lentamente el catéter.
- Para una correcta toma de muestras repetir el procedimiento con el otro orificio nasal.

Muestras de garganta:

- Abrir la boca y sacar la lengua fuera.
- Usar una espátula para presionar a la lengua hacia el fondo de la boca.
- Introducir el hisopo hacia la zona posterior de la faringe y tomar la muestra en ambos lados de la zona tonsilar sin tocar las paredes de la boca.

Enviar la muestra al laboratorio inmediatamente (la sensibilidad del test disminuye con el tiempo).

Enfriar la muestra a 2°-4°C (36°-40°F) durante el almacenaje y transporte.

EQUIPO ADICIONAL

- Guantes desechables
- Cronómetro
- Pipetas

TECNICA

Atemperar, a temperatura ambiente el dispositivo, el diluyente, la muestra y/o controles antes de su uso.

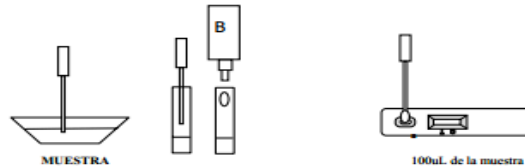
Procedimiento con la muestra de lavado o aspirado nasal

(ver dibujo 1):

Utilizar pipetas y tubos de ensayo diferentes para cada muestra. Añadir 6 gotas o 300 uL del lavado o aspirado nasal recogido en un tubo de ensayo o vial. Añadir 3 gotas o 150 uL del diluyente B y homogeneizar. Sacar el Influenza A+B Cassette de su envase sellado y usar lo más pronto posible. Utilizar un test diferente para cada muestra. Dispensar 100 uL de la muestra homogeneizada en el pocillo del test marcado con una S. Iniciar el tiempo y leer el resultado a los 10 minutos tras dispensar la muestra.

Dibujo 1

Añadir el lavado o aspirado (6 gotas) Añadir diluyente B (3 gotas) y mezclar



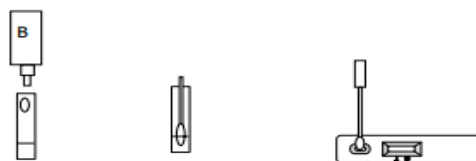
Procedimiento para muestra recogida con hisopo nasofaríngeo

(ver dibujo 2):

Utilizar un tubo de ensayo o vial diferente para cada muestra (hisopo). Añadir 15 gotas o 500 uL en un tubo de ensayo o vial del diluyente B, introducir el hisopo, mezclar y extraer la cantidad máxima posible de líquido a partir del hisopo. Sacar el Influenza A+B Cassette de su envase sellado y usar rápidamente. Utilizar un test diferente para cada muestra. Dispensar 100 uL de la muestra homogeneizada en el pocillo del test marcado con una S. Iniciar el tiempo y leer el resultado a los 10 minutos tras dispensar la muestra.

Dibujo 2

Añadir diluyente B (15 gotas) Introducir el hisopo 100 uL de la muestra



QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L.
08390 Montgat, SPAIN (EU)

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

POSITIVO:

- Influenza A positivo: Dos líneas en la zona central de la ventana, en la zona de resultados, una roja llamada línea de test marcada con la letra T, y en la zona de control una línea verde, línea de control marcada con la letra C.
- Influenza B positivo: Dos líneas en la zona central de la ventana, en la zona de resultados, una azul llamada línea de test marcada con la letra T, y en la zona de control una línea verde, línea de control marcada con la letra C.
- Influenza A+B positivo: Tres líneas de test en la zona central de la ventana, zona de resultados, una roja y una azul marcadas con la letra T, y en la zona de control una línea verde, línea de control marcada con la letra C.

NEGATIVO

Únicamente una línea de color verde se verá en la zona de control marcada con la letra C (llamada línea de control).

INVALIDO

Ausencia total de la línea de control de color verde, a pesar de que aparezcan o no las líneas roja y/o azul en la zona de resultados.

Nota: un volumen insuficiente de muestra, un procedimiento inadecuado o un deterioro de los reactivos podrían ser la causa de la no aparición de la línea de control. Revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si el problema persiste, dejar de utilizar los tests y contactar con su distribuidor.

CONTROL DE CALIDAD

La prueba incluye un control de calidad interno. Cuando la prueba se realiza correctamente aparece una línea verde en el área de control (C). Esta línea confirma que se utilizó el volumen suficiente de muestra y que se siguieron los pasos de procedimiento correctamente.

Se recomienda utilizar un control positivo y un control negativo para verificar el buen funcionamiento de cada nuevo lote de producto en su recepción.

SIGNIFICADO CLINICO

A pesar de que existe una gran variedad de virus capaces de causar infecciones en el tracto respiratorio inferior en niños y adultos, Influenza A+B, Virus Respiratorio Sincitial (RSV), Parainfluenza 1,2 y 3, y Adenovirus suelen ser los más comunes. De éstos, Influenza A+B y RSV son la causa más importante detectada en la atención médica primaria de las enfermedades respiratorias agudas. Además de coincidir en la prevalencia estacional, es importante tener en cuenta que, Influenza A & B y RSV comparten parcialmente las características clínicas y de probabilidad de infección para ciertos grupos de pacientes de alto riesgo (por ejemplo, en los extremos de edad, en enfermos cardiopulmonares y en inmunodeprimidos).

Los virus de Influenza tipo A y tipo B causan epidemias casi todos los inviernos. En Estados Unidos, estas epidemias de Influenza en invierno pueden causar enfermedad en 10-20% de las personas y suelen llevar asociadas una media de 36000 muertes y más de 200000 hospitalizaciones cada año.

CARACTERISTICAS ANALITICAS
Sensibilidad y Especificidad

Diluciones de diferentes extractos del virus fueron testadas directamente sobre la muestra o incluidas en muestras nasales negativas siguiendo las instrucciones del kit.

- Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) strain,
- Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) strain and
- Influenza B/Shanghai/361/2002 strain.

La detección de Influenza tipo A y tipo B muestra >99% de sensibilidad al comparar los resultados con otro test rápido del mercado y una especificidad de >99% frente al mismo test.

Límites de detección

Preparación de diferentes extractos de virus:

- Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) strain (15 µg/mL hemagglutinin)
 - Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) strain (15 µg/mL hemagglutinin)
 - Influenza B/Shanghai/361/2002 strain (15 µg/mL hemagglutinin))
- Fueron diluidas en el diluyente de muestra y testados (con 4 lotes) siguiendo las instrucciones de uso del kit.

Los resultados fueron que bajo estas condiciones, la detección límite, usando la preparación de referencia de antígenos de Influenza A y B es de 4.7 ng/mL HA para Influenza A y 18.75 ng/mL HA para Influenza B.

El uso de anticuerpos monoclonales de ratones en la elaboración de Influenza A+B asegura un alto grado de especificidad para la detección de antígenos de Influenza tipo A y tipo B.

Reacciones cruzadas

Se llevó a cabo una evaluación para determinar la posible reacción cruzada de Influenza A+B Device. No existe ninguna reacción cruzada con algunos patógenos comunes respiratorios, otros organismos y otras sustancias que pueden encontrarse en muestras nasofaríngeas:

- Virus Respiratorio Sincitial
- Adenovirus

NOTAS

1. Influenza A+B Cassette únicamente indica la presencia de virus Influenza en la muestra (detección cualitativa) por lo que deberá ser utilizado solamente para la detección de antígenos tipo A o B de Influenza en muestras nasofaríngeas. Ni la cantidad, ni el aumento de antígenos de Influenza pueden ser determinados por este test.
2. Las muestras a partir de hisopo de garganta y saliva son menos adecuadas que las muestras nasofaríngeas para la detección de virus respiratorios pero pueden ser aceptadas cuando no es posible obtener muestras nasofaríngeas.
3. Si el test muestra un resultado negativo y los síntomas clínicos permanecen, es recomendable la utilización de otras pruebas o métodos. Un resultado negativo no es concluyente para descartar una infección por Influenza.
4. Este test proporciona una presunta infección por Influenza. Todos los resultados deben ser interpretados por un médico junto con todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
5. Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Los test usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

REFERENCIAS

1. BARENFANGER et al., "Clinical and Financial Benefits of Rapid Detection of Respiratory Viruses: an Outcomes Study". Journal of Clinical Microbiology. August 2000, Vol 38 No 8, p. 2824-2828.

CT45301-2/0911
R1.cas

Practica No. 5 Cultivo de Exudado Otico

OBJETIVO:

Realizar el estudio microbiológico de la secreción ótica, incluyendo la identificación de hongos posiblemente presentes.

GENERALIDADES

La otitis media frecuentemente es causada por *Pseudomonas* o especies de *Proteus*. Las otitis agudas o subagudas externas son causadas casi siempre por cocos patógenos.

Los siguientes microorganismos se encuentran con mayor frecuencia en cultivo ótico.

Patógenos o Patógenos potenciales: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Proteus*, *estreptococos* β y α -hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Coliformes y otros bacilos entéricos, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y otros hongos, *Bacteroides*, *fusobacterium* y cocos anaeróbicos.

No patógenos u oportunistas: Estafilococos y micrococcos coagulasa-negativos, Difteroides, Especies de *Bacillus*. Hongos saprófitos.

Microorganismos patógenos que rara vez aparecen en esos cultivos: *Corynebacterium diphtheriae*, Especies de *Actinomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* y otras microbacterias, *Mycoplasma pneumoniae*.

Los medios de cultivo selectivo empleados son: agar sangre, EMB. Vogel-Johnson. Czapeck-Dox (para hongos). El material séptico de oído, sobre todo obtenido en perforación del tímpano. Se recomienda que sea tomado por el otorrinolaringólogo con una técnica especial y condiciones de esterilidad.

La otitis externa, suele ser consecuencia de *P. aeruginosa*; la natación representa un riesgo significativo (oído del nadador). Esta infección localizada puede tratarse con antibióticos tópicos y agentes desecantes, existe una forma más virulenta de la enfermedad (otitis externa maligna), que se asocia a invasión de los tejidos subyacentes potencialmente mortal. Por eso se requiere un tratamiento antimicrobiano agresivo con limpieza quirúrgica

PARTE EXPERIMENTAL:

Material:

Material:

Placa de agar sangre.

Placa de Vogel Johnson.

Placa de EMB.

Placa de Czapeck-Dox.

Agar Dextrosa Saboraud
Hisópos estériles.
Benzal acuoso diluido 1: 1 000
Solución salina estéril

PROCEDIMIENTO:

1. Antes de hacer la toma del producto debe limpiarse cuidadosamente el oído externo con solución acuosa de cloruro de Benzal diluido, para eliminar hasta donde sea posible la flora bacteriana contaminante, debe eliminarse el exceso de antiséptico antes de la toma propiamente dicha, sin embargo, es frecuente observar el desarrollo de bacterias no patógenas y hongos saprofitos.
2. Sembrar en agar sangre, agar Vogel-Johnson, EMB, ADS, e incubar a 37°C durante 24 hrs.
3. Sembrar en agar selectivo para hongos Czapeck-Dox e incubar a 25°C (durante dos a tres semanas) la identificación de los microorganismos aislados se realizará según las normas bioquímicas y seroinmunológicas de cada problema en particular.
4. Realizar dos frotis, fijarlos al calor una vez secos, hacer tinción de Gram y Zielh Neelsen
5. Pasar los hisopos a un tubo con solución salina estéril y realizar un examen en fresco, observar al microscopio en seco débil y fuerte.

Actividad: Realizar un Diagrama de trabajo desde el protocolo de la metodología, medios de cultivos usados, microorganismos posibles de encontrar y pruebas confirmatorias.

1. Al terminar la incubación de los medios utilizado, observar la morfología colonial y microscópica, identificar la flora aislada y si se encuentran microorganismos flora patógena realizar sensibilidad a lo antibióticos.
2. Hacer las observaciones correspondientes, del crecimiento de cada una de las cajas. Dibujar los campos observados en el microscopio.
3. Identificar las colonias.
4. Hacer un reporte del resultado del paciente.
5. Sacar sus conclusiones

BIBLIOGRAFIA:

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.

Unidad IV Infecciones del ojo

Las enfermedades infecciosas del ojo se clasifican según sus agentes provocadores. En la mayoría de casos se trata de bacterias, chlamidias o virus. En algunos casos sólo una parte del ojo es afectado, pero la mayoría de veces se presentan infecciones de la conjuntiva y de la córnea junta. A veces los gérmenes pueden propagarse y causar infecciones en el interior de los ojos que son muy difíciles de tratar.

Bacterias

Los gérmenes más frecuentes son neumococos, estafilococos y estreptococos. Estos causan la conjuntivitis que se presentan comúnmente en ambos ojos y que se caracteriza por los síntomas de ojos amarillentos y purulentos. Si las bacterias atacan la córnea, éstas pueden causar ulceraciones.

Chlamidias

La queratoconjuntivitis por Chlamidias (ataque de la córnea y conjuntiva) es causada por el germen *Chlamydia trachomatis*. Este agente patógeno es el responsable más frecuente de ceguera en India, África y los países mediterráneos. El recorrido de la infección es directo desde la vía urogenital al ojo o se adquiere en las piscinas insuficientemente desinfectadas (Conjuntivitis de piscina). En los adultos es característico la aparición de ampollas localizadas en el párpado superior. La prueba del contagio se realiza con un examen de inmunofluorescencia.

PRACTICA No. 6 “Cultivo de Exudado Conjuntival”

OBJETIVO:

Identificar los microorganismos patógenos y de La flora normal en una maestra de muestra de exudado conjuntival de ambos ojos en una paciente.

FUNDAMENTO:

El agar Brolacin debido a la amplia disponibilidad de sustancias nutritivas que ofrece, a su carencia de sustancias inhibidoras y la posibilidad de lograr una cierta diferenciación de las colonias, se utiliza para cultivar el exudado conjuntival Como sustancia reaccionante, este medio contiene lactosa, la degradación a ácido de esta última origina un viaje de color hacia el amarillo, de azul de bromotimol. La alcalinización provoca un viraje a azul intenso.

El agar Chapman es una agar selectivo para estafilococos, sobre él crecen solamente microorganismos que posean una elevada tolerancia a la sal común; las colonias de Estafilococos son diferenciables utilizando como criterios la degradación de manitol, la gelatinolisis y la formación de pigmento.

MATERIAL:

Caja Petri con agar Cled.

Caja Petri con agar Chapman.

Equipo para tinción de Gram.

Frotes de raspado de conjuntiva.

TECNICA:

Tomar la muestra de la conjuntiva de ambos ojos con un asa de cultivo nueva, e inocular en agar Cled y Chapman al mismo tiempo que se preparan 2 frotis para realizar las tinciones: Gram y Giemsa.

BIBLIOGRAFIA

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECOSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsvier, 2009.

PRÁCTICA NO. 7. Determinación de *Chlamydia trachomatis*

FUNDAMENTO:

El examen está basado en la investigación de *Chlamydia trachomatis* como agente patógeno en el raspado conjuntival por lo que se emplea inmunofluorescencia directa y tinción de Giemsa.

GENERALIDADES:

Durante mucho tiempo se consideró que las clamidias eran virus, ya que son parásitos intracelulares obligados de las células eucarióticas debido a su incapacidad de sintetizar el adenosín trifosfato (A TP), aunque sí pueden sintetizar DNA, RNA Y proteínas. El estudio de este microorganismo, nos ha permitido conocer que son bacterias ya que contiene DNA y RNA, son susceptibles a algunos antibióticos, entre otros a las tetraciclinas y a la eritromicina; tienen una pared trilaminar parecida a la que presenta las bacterias Gram negativas, poseer ribosomas 70 S, tiene diversas enzimas y se multiplican por fisión binaria.

Las clamidias son bacterias INTRACELULARES OBLIGADAS que se diferencian de otras bacterias por su morfología y por presentar un ciclo de desarrollo único durante el cual se pueden observar dos formas, una adaptada a vivir extracelularmente llamada CUERPO ELEMENTAL que mide entre 200 y 400 nm de diámetro, es inefectivo, es antigénico, resistente a la tripsina y útil cuando es inoculado intravenosamente en ratones y otra que se aplica intracelularmente dentro de vacuolas citoplásmicas de las células que están infectando y es llamada CUERPO RETICULAR o CUERPO DE INFUSIÓN, que mide entre 600 y 1500 nm de diámetro. no es inefectivo, es lisado por la tripsina y no es letal para el ratón.

El género *Chlamydia* está constituido por tres especies: *C. trachomatis*, *C. Psittaci* y *C. Pneumoniae* que pueden diferenciarse en base a su susceptibilidad a las sulfonamidas a la morfología de los cuerpos elementales y de los cuerpos reticulares, a la presencia de glucógeno en las inclusiones, al huésped que infectan, a la homología de su DNA y a la presencia de DNA plasmídico.

C. trachomatis es un patógeno exclusivo del hombre, se han descritos tres biovars con 15 serovares, que están relacionados como enfermedades en el humano. El biovar linfogranuloma venereum es el agente de linfogranuloma venéreo que es una enfermedad que se transmite por contacto sexual y se caracteriza por presentar una inflamación granulomatosa de los cambios linfáticos en las regiones inguinal y rectal.

MATERIAL:

Equipo para técnica de Inmunofluorescencia.

Equipo para tinción de Gram.

Frotis de raspado de conjuntiva.

TECNICA:

Tomar la muestra de ambos ojos y preparar 2 frotis para realizar las diferentes tinciones: Inmunofluorescencia y Giemsa.

7.1 Demostración de *Chlamydia trachomatis*: Tinción de Inmunofluorescencia.

- a. Fijar un frote con acetona durante 15 minutos.
- b. Marcar un círculo de aproximadamente 0-5 cm² en la parte inferior del portaobjetos donde se encuentra la muestra.
- c. Colocar 30 microlitros del conjugado (gamaglobulina marcada con isotiocianato de fluoresceína, reactivo comercial).
- d. Dejar actuar el conjugado durante 15 minutos, manteniendo la preparación en cámara húmeda.
- e. Lavar el portaobjetos con solución amortiguadora a pH = 7.2.
- f. Dejar secar al aire, montar la preparación.
- g. Observar en microscopio de fluorescencia

INTERPRETACION: La formación de cuerpos elementales fluorescentes indica que la muestra tiene *C. trachomatis*.

7.2 DEMOSTRACION DE *Chlamydia trachomatis* POR TINCION DE GIEMSA

- a) Fijar un frotis con metanol durante 5 minutos.
- b) Dejar secar
- c) Cubrir la preparación con Giemsa 45 minutos.
- d) Lavar con agua corriente 5 - 10min.
- e) Decolorar con etanol al 70%.2-3 pases rápidos
- f) Alcohol de 96°- 2-3 pases rápidos.
- g) Alcohol isopropílico -3 min.
- h) Dejar secar.
- i) Observar al microscopio.

INTERPRETACION: La presencia de inclusiones intracelulares en las células epiteliales, preferentemente cerca del núcleo, hace sospechar *C. trachomatis*.

BIBLIOGRAFIA

- Manual de Bacteriología Medica IPN 1995

7.3 *Chlamydia trachomatis* IGG por ELISA



Chlamydia Trachomatis IgG Elisa Código: 6001326

Immunoensayo para la identificación de anticuerpos de Chlamydia Trachomatis por IgG en suero humano

Para uso de Diagnóstico In Vitro

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

C. trachomatis es un parásito intracelular patógeno que es casi similar a la estructura de la pared celular de una bacteria gram-negativa siendo causante de una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes. En Estados Unidos más de 4 millones de casos se reportan anualmente, los principales sitios de infección incluyen tracto genito urinario y recto así mismo pueden resultar conjuntivitis, peri hepatitis y artritis reactiva la infección es a menudo asintomática.

Siendo muy difícil diagnosticarla, alrededor de dos terceras partes de las mujeres infectadas son asintomáticas, muchas de ellas desarrollan cervicitis muco purulentay menstruación irregular sangrante o dolor abdominal que ocurre sobre 40% de las mujeres. El dolor inflamatorio pélvico (PID) se manifiesta sobre el 5% de las mujeres infectadas. La enfermedad en los hombre es usualmente sintomática con disuria, descarga de fluido blanquecino produciendo epidermitis. La infección tiene un periodo de incubación entre 7 y 21 días y es común asociarla con enfermedad de transmisión sexual patógenas secundarias.

Los anticuerpos específicos de IgM e IgG de *chlamydia trachomatis* pueden ser detectados de 2 a 4 semanas después de la exposición. Los niveles de IgG se mantienen positivos pero los niveles del anticuerpo pueden disminuir después de cierto tiempo. La ELISA puede detectar los anticuerpos IgM de *C. trachomatis* muchos meses después de la infección.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero Diluido del paciente (el suero diluido contiene material de absorción que remueve el factor reumatoide IgG) se agrega a lo pozos con antígeno purificado. Los anticuerpos IgG específicos si se presentan se unen al antígeno todo el material desunido es lavado, desechado y la enzima conjugada se añade para formar el complejo antígeno-anticuerpo. El exceso de la enzima conjugada es lavada y se añade el sustrato, el plato se incuba y se deja hasta que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato con la enzima. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos en la muestra.

ALMACENAMIENTO

Almacene el equipo entre 2° - 8° C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

| PRODUCTO | 96 PRUEBAS |
|--------------------------------|------------|
| Micro pozos cubiertos con IgG | 12X8X1 |
| Diluyente de muestra 1 botella | 22ml. |
| Calibrador amarillo 1 vial | 1.5 ml. |
| Control positivo 1 vial | 1.5 ml. |
| Control negativo azul 1 vial | 1.5 ml. |
| Enzima conjugado aun botella | 12 ml. |
| TMB sustrato 1 botella | 12 ml. |
| Solución paro HCL 1N | 12 ml. |
| Solución lavadora conc. 20X | 25 ml. |

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión.
2. Agua destilada.
3. Puntas de pipeta desechables.
4. Mezclador Vórtex ó equivalente.
5. Papel absorbente ó toalla de papel.
6. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm ó menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD. ó mayor
7. Papel cuadrulado.

PRECAUCIONES

1. Material potencialmente bio peligroso.
2. El suero y los calibradores son de origen humano fueron probados y no reaccionaron para hepatitis B antígeno de superficie también para anticuerpo HIV. Aprobados por la FDA. Sin embargo no existe un método que pueda ofrecer completa seguridad de ausencia de agentes infecciosos para virus de hepatitis B, HIV y otros agentes. Estos reactivos deben ser tratados con un nivel de bio-seguridad nivel 2, recomendado por el centro de control nacional de enfermedades y en el manual para instituciones de salud bio-seguridad microbiológica y laboratorios biomédicos 1984.
3. A fin de obtener resultados óptimos se recomienda seguir estrictamente el protocolo de la prueba, cuidar la precisión del pipeteo, el tiempo y temperatura indicadas ya que son requerimientos esenciales.
4. No pipetear con la boca, no fumar, comer o beber en las áreas en donde los reactivos y muestras sean manipulados.
5. Los componentes de este equipo deben ser utilizados en forma de unidad integral y los reactivos de diferentes lotes no deben ser mezclados.
6. El suero control y el diluyente de la muestra contienen conservador de acida de sodio, considerado potencialmente muy reactivo en contacto con el cobre y el plomo; o explosivo en contacto con el metal. Deseche con grandes volúmenes de agua.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y MANIPULACIÓN

1. Recolectar l muestra de sangre y separarla del suero.
2. La muestra puede ser refrigerada entre 2-8° C por un periodo de 7 días o congelar por un periodo de 6 meses. Evite congelamientos repetitivos del suero de la muestra.

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

1. Traer todas las muestras y reactivos para llevarlos a la temperatura ambiente (20-25° C) y mezclar gentilmente.
2. Preparar solución buffer a 1X agregando el contenido de la botella de 25 ml que esta a 20X y llevarlos a 475 ml. De agua destilada o desionizada a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Separe el número de tiras a utilizar.
2. **El control negativo y positivo así como el calibrador están listos para usarse.** Preparar una dilución de las muestras 1:21 agregando 10µl de la muestra a 200 µl de diluyente de la muestra y mezcle.

3. Dispensar 100µl de suero diluyente, calibrador y controles dentro de los pozos adecuados. para el reactivo blanco dispensar 100µl de muestra diluyente en la posición 1ª del micro lector. golpear levemente el pozo para remover las burbujas que se encuentran mezcladas con la solución. incubar por 20 minutos a temperatura ambiente
4. Remover el líquido de los pozos, repetir el tiempo de lavado por tres veces con la solución buffer
5. agregar 100µl de la enzima conjugada a cada pozo e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. remover la enzima conjugada de los pozos repetir el tiempo de lavado en tres tiempos con la solución buffer
7. Agregar 100µ de TMB solución substrato e incubarlo por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. agregar 100µl de solución stop.
9. Lea O.D a 450 nm. Con un Lector de ELISA durante los primeros 15 minutos.

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRITICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARA COMO RESULTADO IMPRECISION Ó LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

CALCULO DE RESULTADOS

1. Checar el factor de calibración (CF) valorado en la botella del frasco, este valor puede ser que varíe de lote a lote marque y cheque con seguridad en cada equipo.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por el factor de calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador OD = 0.8
 Factor de calibración = 0.5
 Valor del Punto de corte = $0.8 \times 0.5 = 0.400$
 Control positivo OD=1.2
 Anticuerpo (Index)= $1.2/0.4=3$
 Muestra del paciente OD = 1.6
 Anticuerpo (Index) $1.6/0.4= 4.0$

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse valida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico.

1. El OD. Del calibrador debe considerarse por arriba de 0.250
2. El Anticuerpo (Index) para control negativo debe ser por debajo de 0.9
3. El anticuerpo (Index) para control positivo debe ser superior al 1.2.

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente esta planeado como guía para la interpretación de los resultados de *C. trachomatis* por IgG cada laboratorio se encargara de establecer un criterio para la interpretación basándose en las muestras populares encontradas.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS (index)

<0.9 anticuerpo no detectado de *C Trachomatis* por ELISA.
 0.9-1.1 sobre el limite positivo se recomienda otra identificación clínica
 >1.1 anticuerpo detectado de *C Trachomatis*. por Elisa.

LIMITACIONES

Los resultados obtenidos en el ensayo de *C.trachomatis* solo sirven como auxiliar en el diagnostico de la enfermedad y solo debe ser interpretada en relación con el historial clínico y físico del paciente y corroborado con otro método de diagnostico. Las muestras hemolizadas o lipemicas pueden ser causas de error.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Sensibilidad y Especificidad

112 sueros de pacientes fueron probados por *C trachomatis* ELISA en IgG 15 sueros fueron positivos y 94 sueros negativos por combinación de métodos (97% acordado) arrojaron los siguientes resultados.

| Referencia Equipo De Elisa | C. trachomatis Elisa. | | |
|-------------------------------|-----------------------|----|-------|
| | + | - | Total |
| + | 15 | 2 | 17 |
| - | 1 | 94 | 95 |
| Total | 16 | 96 | 112 |

PRECISION

Ensayos intra estudio

| Suero | No replicas | Supuestos | Desviación estándar | Coefficiente de variación |
|-------|-------------|-----------|---------------------|---------------------------|
| 1 | 16 | 1.72 | 0.063 | 3.66 |
| 2 | 16 | 1.42 | 0.059 | 4.15 |
| 3 | 16 | 0.25 | 0.014 | 5.65 |

BIBLIOGRAFIA

1. Poussin M. Fuentes V; Corbel C; Prin L; Eb F; Orfilia J. Capture ELISA: a new assay for the detection for the immunoglobulin M isotype antibodies using Chlamydia T. Antigen.J immun Methods,1997;204(1):1-12.

Distribuido por:
 Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
 01800-111-4343
 www.grupomexlab.com

Rev. 08-2011

Unidad V Infecciones de las vías respiratorias inferiores

Cerca del 30% de las infecciones del paciente con EPOC son debidas a virus.

Los virus respiratorios suelen tener una relación muy clara con la estación del año. No siempre son ellos la causa directa de la infección. ¿Qué quiere decir esto?. Los virus pueden dañar la mucosa bronquial y favorecer así el asentamiento de bacterias causantes del cuadro infeccioso. El virus es, por una parte, difícil de diagnosticar, y, por otra, carece de tratamiento específico.

- **VIRUS:** *Virus respiratorio sincivial, Virus influenzae, Virus parainfluenzae, Coronavirus, Rhinovirus, Adenovirus.*
- **BACTERIAS:** *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Pseudomona aeruginosa, Enterobacterias, Staphilococcus aureus, Streptococcus spp., Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae*

El papel de las bacterias ha sido muy estudiado. Por desgracia, tampoco resulta sencillo su diagnóstico. Esto se debe a que como ya hemos comentado anteriormente, en estos pacientes se produce con mucha frecuencia una colonización de la mucosa por bacterias. La obtención de esputo para hacer un análisis microbiológico del mismo no es sencillo porque no siempre el paciente puede expectorar. Además los resultados pueden ser confusos al obtener en ocasiones diferentes tipos de bacterias.

El examen de la expectoración se complica por el hecho de que contiene muchos gérmenes potencialmente patógenos, como comensales en la garganta normal.

PRÁCTICA No. 8. Cultivo de expectoración

MATERIAL

Cajas Petri Con: Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar Macconkey, Agar Sal Y Manitol, Agar De Biggy. Agar Dextrosa y Saboraud, Agar de Lowestein-Jensen.

Equipo de tinción de Gram

Equipo de tinción de Zielh Neelsen.

TECNICA

1. Debe instruirse al cuerpo de enfermeras a que enseñen a los enfermos a recoger esputo y no saliva.
2. Se describe el aspecto macroscópico del esputo: purulento, sanguinolento, con sangre digerida y su cantidad.
3. Se prepara un frotis que se examina al microscopio después de teñido por el método de Gram. Pueden encontrarse *Candida*, *Actinomyces* o *Blastomyces*, o sospecharse angina de Vincent.
4. Suele prepararse el cultivo directamente en agar sangre, de preferencia sembrando varias asas de esputo en distintas zonas de la placa.
Un disco impregnado de bacitracina y factor V permite inhibir muchos microorganismos, y facilita el desarrollo de *Haemophilus* sp. También es útil para distinguir entre varios microorganismos una placa con agar de MacConkey.
5. Si existe la solicitud correspondiente o si está indicado, se examina el esputo por la técnica de Ziehl Neelsen y se preparan cultivos para bacilos de la tuberculosis u hongos.
6. En vista de la naturaleza mixta de la flora de casi todos los esputos, y de la posible duda en cuanto a poder patógeno, es prudente buscar un desarrollo predominante de cualquier germen particular y anotarlo en caso de que sea intenso.

Se menciona a continuación una lista de los microorganismos que se encuentran en el esputo. El estudiante debe recordar que algunas colonias de estos microorganismos representan comensales normales, pero que un desarrollo intenso o predominante es

muchas veces significativo. Algunos microorganismos como *Corynebacterium diphtheriae* y *M. tuberculosis* siempre significan enfermedad, *Streptococcus pneumoniae* *Staph. aureus* *N eisseria* sp, *Escherichia* *Corynebacterium diphtheriae* *Candida* sp Difteroides, *Klebsiella*, *Haemophilus* sp, *Actinomyces* *Mycobacteria*, *B. anitratum*

Tratamiento del esputo con pancreatina

Algunos esputos son muy viscosos, y es difícil obtener cultivos representativos. Para resolver este problema, se utiliza pancreatina amortiguada al 1 por 100. La enzima digiere el moco viscoso y la muestra es más fácil de manejar. Se encuentra en el comercio t pancreatina amortiguada bajo forma de comprimidos que se disuelven en agua destilada para el uso. La enzima no actúa sobre las bacterias en el tiempo que requiere la prueba; no afecta a los hongos en el esputo, aun después de varios días.

TECNICA (Tratamiento del esputo con pancreatina)

1. Se mezclan cinco volúmenes de suero fisiológico estéril y un volumen de esputo y se agita. El suero fisiológico sobrenadante, con la mayor parte de la saliva, se remueve con una pipeta de Pasteur.
2. A la muestra lavada se añade un volumen igual de pancreatina amortiguada al 1 por 100 recientemente preparado y se agita.
3. Se pone en baño tibio a 37°C y se incuba, agitando de cuando en cuando hasta que la licuación sea completa. Casi todos los esputos se licuan en menos de 90 minutos. La velocidad con que ascienden las burbujas en el líquido, después de agitarlo, permite apreciar el grado de licuación.
4. Cuando la licuación es completa, se centrifuga, se desecha el líquido sobrenadante y se siembra el sedimento en el medio de elección.

PRACTICA No. 9. Mycoplasma pneumoniae.

Causas, incidencia y factores de riesgo

La neumonía es una enfermedad común que afecta a 1 de cada 100 personas anualmente y es producida por muchos tipos diferentes de virus, bacterias y otros organismos infecciosos. Se estima que cada año se presentan 2 millones de casos en los Estados Unidos. La mayoría de los casos de neumonía son leves y se tratan fácilmente, mientras que otros casos son más serios y pueden ocasionar una enfermedad severa o incluso la muerte.

El *Mycoplasma pneumoniae* es una causa común de neumonía leve y afecta, por lo general, a las personas menores de 40 años. Varios estudios sugieren que esta enfermedad produce entre el 15 y el 50% de todas las neumonías en adultos e incluso un porcentaje más alto en los niños de edad escolar.

Las personas que se encuentran en mayor riesgo de adquirir neumonía por micoplasma incluyen aquellos que viven o trabajan en áreas concurridas como escuelas y hogares de personas abandonadas, aunque muchas personas que contraen la condición no presentan un factor de riesgo que se pueda identificar.

Los pneumoniae del mycoplasma son un miembro de la clase Mollicutes, significando la piel suave. Junto con los otros miembros de este micoplasma de la clase (Acholeplasma, Anaeroplasma, Asteroleplasma, Spiroplasma, y Ureaplasma) son caracterizados por su genome inusualmente pequeño así como su carencia completa de una pared bacteriana de la célula. *Los pneumoniae del M.* primero fueron ligados a las infecciones respiratorias en 1898 en que los roux y Nocard aislaron los organismos de especímenes del pleuropneumonia de los bóvidos. *Los pneumoniae del M.* se piensan actualmente para ser responsables de tracheobronchitis y la pulmonía anormal primaria, sin embargo, mucha de la investigación con respecto a esta bacteria está estando en conflicto. Aunque *los pneumoniae del M.* tienen uno de los genomes sabidos más pequeños, todavía hay mucho que se aprenderá sobre este insecto del misterio.

Estructura:

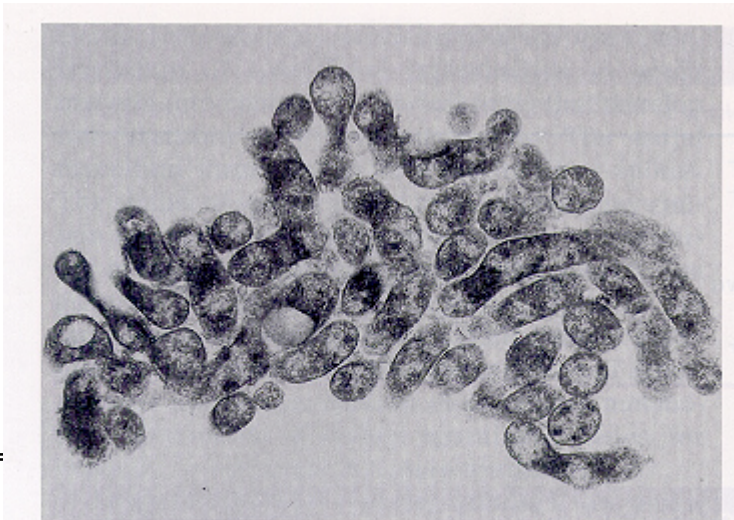
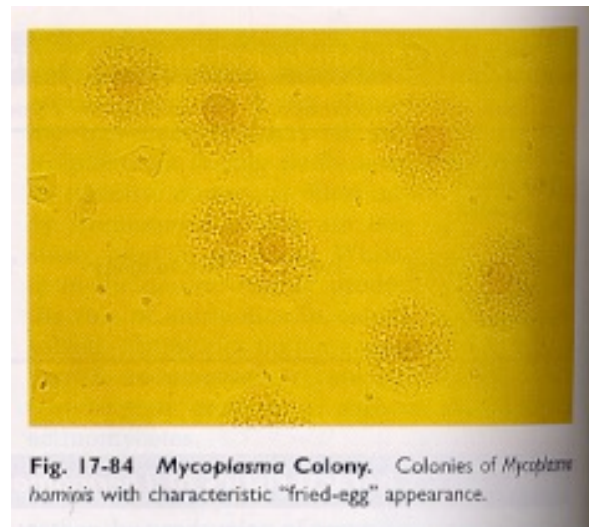


Fig. 17-83 Mycoplasma. Electron micrograph of *Mycoplasma pneumoniae*. The cell lacks a cell wall and is bounded by a cytoplasmic membrane that has a trilaminar structure.

Los pneumoniae del mycoplasma carecen una pared de la célula que conduzca a la inestabilidad osmótica. Para crear una cierta ayuda estructural, *los pneumoniae del M.* utilizan los esterolos, como las células eukaryotic, en su membrana triple-acodada (fig. 17-83 del atlas, Ronald M. Principes de la microbiología,

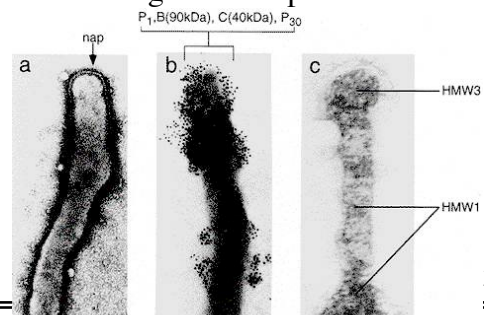
2da edición. Editores De Wm.C.Brown, Dubuque, IA. 1997. la página 1046). la bacteria puede poder sobrevivir sin una pared porque vive en un ambiente osmóticamente estable, el anfitrión (humano) animal de la célula, así como su red de la proteína que se asemeje a un citoesqueleto ancestral. La combinación de estas características únicas crea un diverso panorama para el tratamiento de una infección mycoplasmal que otras bacterias. La carencia de una pared de la célula previene la utilización de un antibiótico del B-b-lactam, tal como penicilina y cycloserine, porque actúan específicamente para interrumpir la pared de la célula. El uso del colesterol en *pneumoniae del M.*, sin embargo, permite una diversa avenida para las terapias antibióticas generalmente ineficaces en bacterias, tales como el uso de polyenes.

La ausencia de una pared de la célula es probable facilitar una bacteria para recibir la interacción con la cual los compuestos pueden ser intercambiados. Esta transferencia puede incluir no solamente los alimentos y los aminoácidos suplementarios, el etc. que es necesario para la ayuda del crecimiento bacteriano, pero también compuestos metabólicos tóxicos. Se piensa que este parasitismo superficial bacteriano causa daño severo a la célula huesped, sin embargo, no una toxina se haya identificado como el culpable.



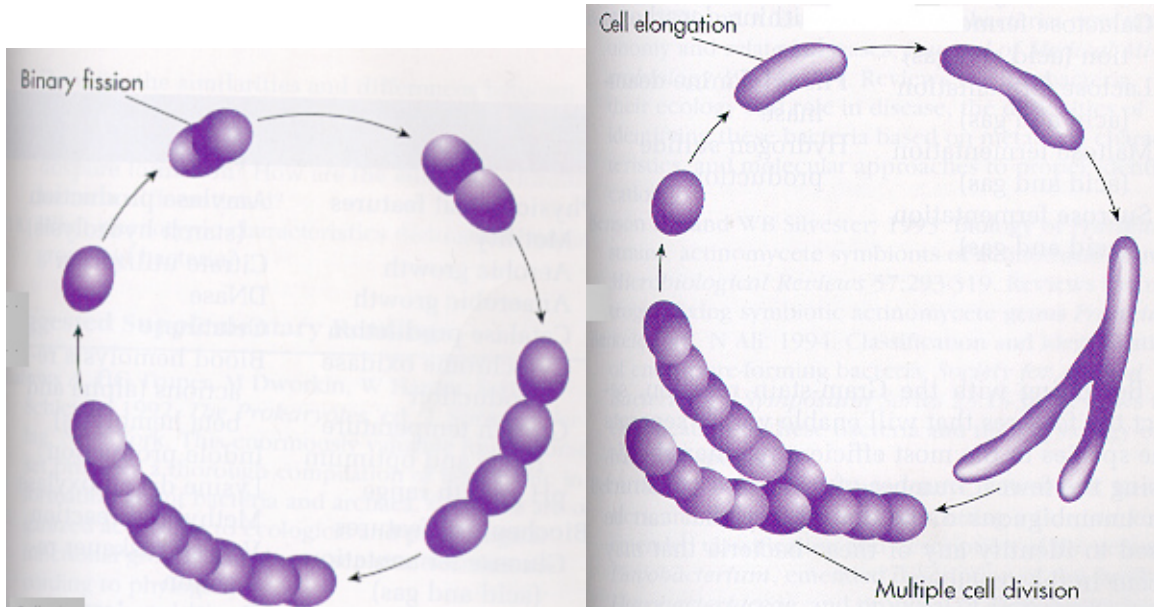
La morfología de las colonias del mycoplasma se compara a menudo a un "frei'r-huevo" porque forman una base central densa, que penetra hacia abajo en el agar, rodeado por un área que se separa circular que sea más ligera en color.

Muchas de la especie patógena del mycoplasma expresan los organelles especializados de la extremidad usados para hacer el contacto directo con las células eukaryotic. Estos organelles son supremos en la virulencia asociada a *pneumoniae del M.*

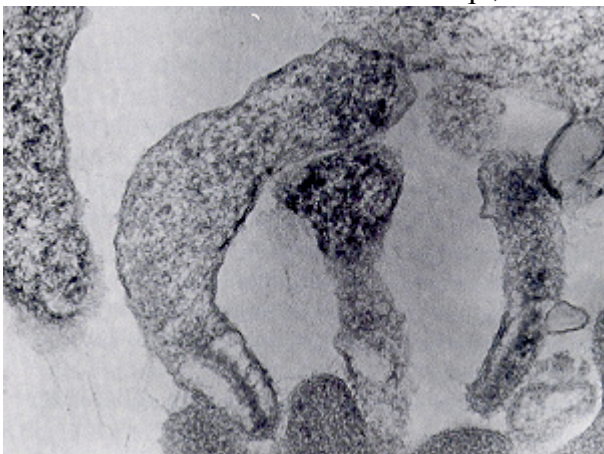


Transmisión e infección a través del mundo:

Los *pneumoniae del mycoplasma* se pueden comunicar a través de contacto personal cercano vía gotitas respiratorias. Algunos investigadores han notado un predominio de las infecciones que ocurrían en la caída y el invierno. Mientras que esta teoría no se reconoce extensamente para ser verdad, hay mucha evidencia para sugerir que la pulmonía causada por una infección de los *pneumoniae del M.* completa un ciclo con poblaciones cada 4 a 5 años. El ciclo vital de los *pneumoniae del M.* puede seguir dos trayectorias. Se reproduce o con la fisión binaria o el alargamiento de la célula followed por divisiones múltiples de la célula para formar las células del coccoid.



Atlas, Ronald M. Principes de la microbiología, 2da edición. Editores De Wm.C.Brown, Dubuque, IA. 1997. página 1046



La investigación reciente ha encontrado un receptor en la superficie de los *pneumoniae del M.* pensados para ser integral en el accesorio a la superficie de la célula huésped. Este receptor puede unir a un número de diversos tipos de la célula tales como epithelia de la zona respiratoria y células de sangre rojas. En las altas concentraciones, los *pneumoniae del M.* pueden inhibir la acción ciliary dentro de la zona respiratoria así como necrosis de la célula de la causa. Esta daños es causada

por los cytotoxins de *pneumoniae del M.* así como indirectamente de la inmunorespuesta del anfitrión.

Síntomas

Los síntomas generalmente son leves y aparecen en un período de 1 a 3 semanas y, en algunas personas, pueden progresar a un estado más severo.

Entre los síntomas comunes se incluyen los siguientes:

- Dolor de cabeza
- Fiebre que puede ser alta
- Escalofrío
- Sudoración excesiva
- Tos
 - con frecuencia seca
 - generalmente sin flema ni sangre
- Dolor en el tórax
- Irritación de la garganta

Otros síntomas observados con menos frecuencia son:

- Lesiones de la piel o erupción cutánea
- Irritación o dolor en los ojos
- Dolor muscular y rigidez articular
- Tumorción en el cuello
- Frecuencia respiratoria rápida
- Dolor de oído

Signos y exámenes

Un examen físico puede mostrar agrandamiento de los ganglios linfáticos e inflamación del tímpano.

El examen de tórax con el estetoscopio (auscultación) permite escuchar las crepitaciones.

Estos exámenes ayudan a confirmar el diagnóstico:

- Exámenes de sangre para anticuerpos contra micoplasma
- Cultivo de esputo
- Radiografía de tórax

Para uso de Diagnóstico In Vitro

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

M. Pneumoniae es un espectro de presentaciones clínicas que van de la asintomatología hasta una pronunciada neumonía. Los síntomas inician de 6 a 32 días después de la exposición con dolor de cabeza, malestar, tos, irritación de la garganta y fiebre. La enfermedad puede terminar a los pocos días o durar meses o más. La detección por Elisa de los anticuerpos IgG de *M. pneumoniae* o la demostración de un significativo incremento de anticuerpos específicos IgG es una fuerte evidencia de una infección reciente. En una evaluación clínica apropiada los anticuerpos específicos IgM típicos se incrementan significativamente una semana después del comienzo y el incremento de los niveles de IgG específico en la segunda semana los IgM de *M. pneumoniae*. Sin embargo puede persistir por más de dos años después de la infección y por tanto la detección por IgM específico no es un indicador preciso del tiempo de infección. La infección primaria y la reinfección pueden ser distinguidas por la presencia de IgA específico o IgM específico en infección primaria y por la elevada presencia de de IgA específico en la ausencia de IgM específico en suero recolectado entre 10-20 días después del inicio y es una fuerte evidencia en contra de la neumonía primaria debido a *M. pneumoniae*.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente se agrega a lo pozos con antígeno purificado de *antisalmonella*. Los anticuerpos específicos IgG de *antisalmonella* si se presentan se unen al antígeno. Todo el material desunido es lavado, desechado y la enzima conjugada se añade para formar el complejo antígeno-anticuerpo.

El exceso de la enzima conjugada es lavada y se añade el sustrato, el plato se incuba y se deja hasta que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato con la enzima. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos en la muestra.

ALMACENAMIENTO

Almacene el equipo entre 2° - 8° C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

| PRODUCTO | 96 PRUEBAS |
|--------------------------------|------------|
| Micro pozos cubiertos con IgG | 12X8X1 |
| Diluyente de muestra 1 botella | 22ml. |
| Calibrador amarillo 1 vial | 1.5 ml. |
| Control positivo 1 vial | 1.5 ml. |
| Control negativo azul 1 vial | 1.5 ml. |
| Enzima conjugada una botella | 12 ml. |
| TMB sustrato 1 botella | 12 ml. |
| Solución stop | 12 ml. |
| Solución lavadora conc. 20X | 25 ml. |

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión.
2. Agua destilada.
3. Puntas de pipeta desechables.
4. Mezclador Vórtex ó equivalente.
5. Papel absorbente ó toalla de papel.
6. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm ó menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD. ó mayor
7. Papel cuadrículado.

PRECAUCIONES

1. Material potencialmente bio peligroso.
2. El suero y los calibradores son de origen humano fueron probados y no reaccionaron para hepatitis B antígeno de superficie también para anticuerpo HIV. Aprobados por la FDA. Sin embargo no existe un método que pueda ofrecer completa seguridad de ausencia de agentes infecciosos para virus de hepatitis B, HIV y otros agentes. Estos reactivos deben ser tratados con un nivel de bio-seguridad nivel 2, recomendado por el centro de control nacional de enfermedades y en el manual para instituciones de salud bio-seguridad microbiológica y laboratorios biomédicos 1984.
3. A fin de obtener resultados óptimos se recomienda seguir estrictamente el protocolo de la prueba, cuidar la precisión del pipeteo, el tiempo y temperatura indicadas ya que son requerimientos esenciales.
4. No pipetear con la boca, no fumar, comer o beber en las áreas en donde los reactivos y muestras sean manipulados.
5. Los componentes de este equipo deben ser utilizados en forma de unidad integral y los reactivos de diferentes lotes no deben ser mezclados.
6. El suero control y el diluyente de la muestra contienen conservador de acida de sodio, considerado potencialmente muy reactivo en contacto con el cobre y el plomo; o explosivo en contacto con el metal. Deseche con grandes volúmenes de agua.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y MANIPULACIÓN

1. Recolectar l muestra de sangre y separarla del suero.
2. La muestra puede ser refrigerada entre 2-8° C por un periodo de 7 días o congelar por un periodo de 6 meses. Evite congelamientos repetitivos del suero de la muestra.

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

1. Traer todas las muestras y reactivos para llevarlos a la temperatura ambiente (20-25° C) y mezclar gentilmente.
2. Preparar solución buffer a 1X agregando el contenido de la botella de 25 ml que esta a 20X y llevarlos a 475 ml. De agua destilada o desionizada a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Separe el número de tiras a utilizar.
2. **El control negativo y positivo así como el calibrador están listos para usarse.** Preparar una dilución de las muestras 1:21 agregando 10µl de la muestra a 200 µl de diluyente de la muestra y mezcle.

3. Dispensar 100µl de suero diluyente, calibrador y controles dentro de los pozos adecuados. para el reactivo blanco dispensar 100µl de muestra diluyente en la posición 1ª del micro lector. golpear levemente el pozo para remover las burbujas que se encuentran mezcladas con la solución. incubar por 20 minutos a temperatura ambiente
4. Remover el liquido de los pozos, repetir el tiempo de lavado por tres veces con la solución buffer
5. Agregar 100µl de la enzima conjugada a cada pozo e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Remover la enzima conjugada de los pozos repetir el tiempo de lavado en tres tiempos con la solución buffer
7. Agregar 100µ de TMB solución sustrato e incubarlo por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. agregar 100µl de solución stop.
9. Lea O.D a 450 nm. Con un Lector de ELISA durante los primeros 15 minutos.

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRITICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARÁ COMO RESULTADO IMPRECISION O LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

CALCULO DE RESULTADOS

1. Checar el factor de calibración (CF) valorado en la botella del frasco, este valor puede ser que varíe de lote a lote marque y cheque con seguridad en cada equipo.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por el factor de calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador OD = 0.8
 Factor de calibración = 0.5
 Valor del Punto de corte = $0.8 \times 0.5 = 0.400$

Control positivo OD=1.2
 Anticuerpo (Index)= $1.2/0.4=3$

Muestra del paciente OD = 1.6
 Anticuerpo (Index) $1.6/0.4= 4.0$

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse valida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico.

1. El OD. Del calibrador debe considerarse por arriba de 0.250
2. El Anticuerpo (Index) para control negativo debe ser por debajo de 0.9
3. El anticuerpo (Index) para control positivo debe ser superior al 1.2.

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente esta planeado como guía para la interpretación de los resultados de anticuerpo *C. pneumonia* Por IgG cada laboratorio se encargara de establecer un criterio para la interpretación basándose en las muestras populares encontradas.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS (Index)

<0.9 anticuerpo no detectado de *C. pneumonia* por ELISA.
 0.9-1.1 sobre el limite positivo se recomienda otra identificación clínica
 >1.1 anticuerpo detectado de *C. pneumonia* por Elisa.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los resultados obtenidos en el ensayo de anticuerpo *C. pneumonia* solo sirven como auxiliar en el diagnostico de la enfermedad y solo debe ser interpretada en relación con el historial clínico y fisico del paciente y corroborado con otro método de diagnostico. Las muestras hemolizadas o lipemicas pueden ser causas de error.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Sensibilidad y Especificidad

47 sueros de pacientes fueron probados por anticuerpo *C. pneumonia* ELISA en IgG 109 sueros fueron positivos y 31 sueros negativos por ambos métodos. (95% acordado) arrojaron los siguientes resultados.

| Referencia Equipo de Elisa | anticuerpo <i>C. pneumonia</i> IgG por Elisa | | |
|-------------------------------|---|----|-------|
| | + | - | Total |
| + | 109 | 4 | 113 |
| - | 3 | 31 | 34 |
| Total | 112 | 35 | 147 |

PRECISIÓN

Estudios Intra-Ensayo

| Suero | No replicas | Media | Desviación estándar | Coefficiente de variación |
|-------|-------------|-------|---------------------|---------------------------|
| 1 | 16 | 1.77 | 0.08 | 4.5 |
| 2 | 16 | 0.97 | 0.06 | 6.2 |
| 3 | 16 | 0.15 | 0.01 | 6.6 |

Estudios Inter-Ensayo

| Suero | No replicas | Media | Desviación Estándar | Coefficiente de variación |
|-------|-------------|-------|---------------------|---------------------------|
| 1 | 10 | 1.54 | 0.13 | 8.4 |
| 2 | 10 | 0.85 | 0.07 | 8.2 |
| 3 | 10 | 0.18 | 0.02 | 12.7 |

BIBLIOGRAFIA

1. Diagnosis of atypical pneumonias. Legionella, Chlamydia and Mycoplasma infections. Ann Intern Med 1996, 124-591-4
2. Cimolai N Choeng. ACH. An assessment of a new diagnostic indirect enzyme immunoassay for the detection of anti-Mycoplasma pneumoniae IgM. Am J. Clin. Patol 1996, 105: 205-9
3. Sherman MJ, Cubie HA, Inglis JM. Mycoplasma Pneumoniae infection: early diagnosis by detection of specific IgM by immunofluorescence. Br J Biomed Sci 1993; 50:305-8.

Distribuido por:
 Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
 01800-111-4343
 www.grupomexlab.com

Rev. 08-2011

Unidad V1. INFECCIONES DE LAS VÍAS URINARIAS

La orina secretada en el riñón es estéril salvo que dicho órgano este afectado. La orina sin contaminar de la vejiga es normalmente estéril. Sin embargo, en la uretra se halla un flora normal, de modo que la orina expulsada en forma normal contiene una pequeña cantidad de bacterias. Debido a que es necesario distinguir los microorganismos contaminantes de los de importancia etiológica, solo el examen cualitativo de la orina puede producir resultados significativos.

PRACTICA No. 10 Urocultivo

OBJETIVO:

El alumno conocerá la metodología para el diagnóstico vías urinarias.

Para un examen urinario apropiado es estéril.

- A. *Recolección apropiada del espécimen:* Es el paso mas importante en un urocultivo se utiliza la orina de la mañana. En varones por lo general se obtienen especímenes satisfactorios, aseando el meato con jabón y agua y recolectando en un envase estéril la porción media de la orina expulsada: en mujeres pueden conseguirse especímenes equivalentes después de haber separado los labios y aseando la vulva. Debido a que muchas especies de microorganismos se multiplican con rapidez en la orina a la temperatura ambiente o a la temperatura corporal, los especímenes deben enviarse pronto al laboratorio o refrigerarse por un tiempo no mayor que una noche.
- B. *Examen microscópico:* Es un método rápido para el diagnóstico de las infecciones de vías urinarias.
- Se analiza una gota de orina fresca sin centrifugar para revelar leucocitos, células epiteliales y también bacterias, si hay mas de 10^5 por mililitro. El hallazgo de 10^5 microorganismos sobre mililitro en un espécimen de orina recolectada en forma apropiada es una fuerte prueba de infección activa de las vías urinarias (de la vejiga o de las porciones superiores del aparato urinario. Cuentas menores de 10,000 microorganismos por ml se toman como contaminantes.

Un frotis teñido con Gram sin centrifugar, que muestra bacilos Gram

negativos es diagnóstico de infección urinaria. La centrifugación breve de la orina sedimenta con facilidad las células de pus, que pueden arrastrar consigo bacterias y por lo tanto ayudar al diagnóstico microscópico de la infección. Puede haber células de pus sin bacterias y a la inversa, puede haber bacteriuria sin piuria. La presencia de numerosas células epiteliales escamosas, lacto bacilos o flora mixta sugiere una recolección incorrecta de la orina.

El examen bacteriológico de la orina se hace principalmente cuando los signos y síntomas son sugestivos de infección de las vías urinarias, insuficiencia renal o hipertensión. Siempre deberá hacerse en quien se sospeche una infección generalizada y en los que presenten fiebre de origen desconocido. Es conveniente en mujeres durante el primer trimestre del embarazo.

El presente examen se basa en la cuantificación de unidades formadoras de colonias desarrolladas en los diferentes medios inoculados: Brolacin, EMB y Agar Sangre de carnero.

MATERIAL:

Pipetas de 1 y 10ml.
Tubos de 16 x 150 con tapón de rosca.
Placas de Agar Cled, Sal y Manitol,
EMB y Agar sangre. Asa calibrada en
0.001 ml.
Portaobjetos y cubreobjetos
Equipo de Gram.
Pipeta Pasteur.

TECNICA

1. Agitar el frasco y colocar una gota entre porta y cubreobjetos. Observar al microscopio Utilizando el objetivo seco-fuerte. Contar el promedio de leucocitos por campo.
2. Colocar una gota sin extender, dejar secar fijar y teñir con Gram, observar con inmersión. Contar las bacterias u los leucocitos por campo microscópico.
3. Agitar el frasco y colocar 0.1 ml. en 9.9 ml. de solución salina estéril. Homogeneizar y agregar 0.1 ml de esta dilución sobre la caja estéril de Agar Cled, sembrar masivamente al inculo.

4. Tomar una asada de orina con el asa calibrada y descargar en línea recta en el centro de la placa de Agar sangre, Sal y Manitol y EMB y estriar masivamente.
5. Incubar las cajas a 37°C por 24-72 hrs.
6. Contar el número de colonias que desarrollan en la placa. De acuerdo al volumen que tome el asa calibrada y la (s) dilución (es), determinar el numero de bacterias por ml de orina.
7. Si de acuerdo con el criterio de Kass y Sanford el número de bacterias es mayor de *100,000 UFC* por ml se procede a identificar el microorganismo por los métodos usuales y realizar antibiograma.
8. Informar el número de bacterias por ml, así como que microorganismo se identifico y su comportamiento frente a los antimicrobianos probados.

RESULTADOS

1. Realizar un diagrama de trabajo.
2. Hacer las observaciones correspondientes, del crecimiento de cada una de las cajas.
3. Dibujar los campos observados en el microscopio.
4. Identificar las colonias.
5. Hacer un reporte del resultado del paciente.
6. Sacar sus conclusiones
7. Bibliografía.

BIBLIOGRAFÍA:

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
7. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.

8. STESPICER, W.J.: *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2^a Ed.). Elsevier. 2009.
9. IOVINE –SELVA. El Laboratorio en la Clínica Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 992 y 993

Unidad VII ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Comprenden varios tipos de enfermedades que normalmente se transmiten o contagian durante las relaciones sexuales con penetración. Las principales vías de transmisión son las mucosas de la boca, los órganos genitales y el ano durante la relación coital. Están causadas por virus, microbios, gérmenes microscópicos, y bacterias.

El aparato genital masculino y femenino contienen epitelio transicional, columnar y escamoso; tales características lo hacen adecuado para la colonización de bacterias, levaduras y protozoarios; algunos de estos pasan a formar parte de lo que se considera biotnormal. En la uretra se encuentra los estafilococos coagulosa negativos, las corinebactérias y bacterias anaerobias. La vulva y el pene, especialmente el área que cubre el prepucio pueden tener micobacterium smegmatis además de otras bacterias Gram positivas.

La biota de los genitales femeninos varia con el pH y la concentración de estrógenos que a su vez depende de la edad. En mujeres prepúberes y posmenopáusicas predominan los microorganismos que tienen su asiento en piel como los estafilococos y corinebacterias, mientras que, las mujeres con edad reproductiva pueden albergar grandes cantidades de enterobacterias estreptococos y estafilococos: así como bacterias anaerobias esporuladas y no esporuladas, lactobacilos y cocos. Muchas mujeres son portadoras de estreptococos betahemolíticos del grupo B. el cual en determinadas circunstancias infecta el neonato durante el paso por el canal del parto, dando origen a una enfermedad sistemática.

Práctica No. 11 y 12 “Cultivo de Exudado Cervico-Vaginal y Exudado Uretral”

Aislar e identificar los géneros y especies bacterianas responsables de procesos infecciosos en genitales, mediante la utilización de medios enriquecidos, selectivos diferenciales, así como el uso de pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas cuando sean necesarios.

El examen se basa en el cultivo del exudado vaginal y uretral con el fin de identificar la flora normal y patógena, pudiendo de esta manera detectar diferentes infecciones en el aparato genital de ambos pacientes. Con el fin de apoyar el diagnóstico del médico y siguiendo el cuadro clínico que presenta el paciente.

MATERIAL:

Placas con medios de Thayer-Martín, agar sangre, Agar Casman, E.M.B., Sal y manitol ó S-110 ó Chapman y Nickerson o Biggy.

Tubos de ensaye con medios de transporte de Stuart.

Tubos de ensaye con medios de transporte de tioglicolato.

Material para tinción de Gram.

TECNICA: “Exudado Cervico – Vaginal”

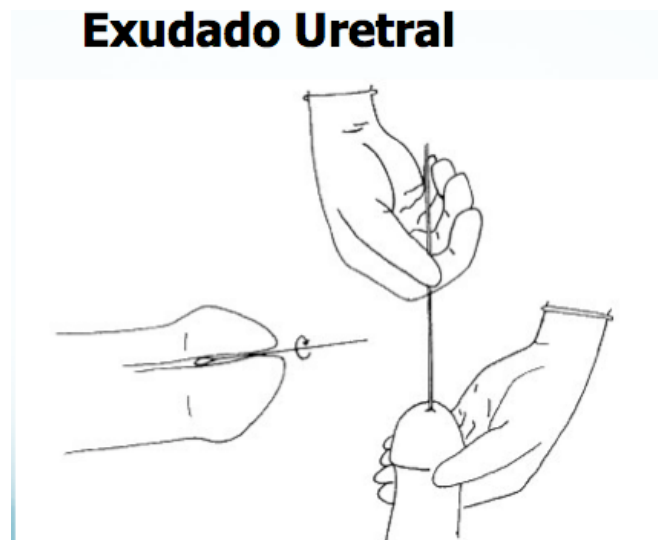
1. Aunque es mejor la toma directa de la muestra por el alumno, por necesidad de los exudados se proporciona en tubos con 1-2 ml. de solución salina estéril y deben procesarse de inmediato.
2. Medir el pH de la muestra aunque se recomienda hacerlo "in sitio".
3. Poner una gota entre un portaobjeto y cubreobjeto y observar la preparación en fresco.
4. Hacer un frotis, teñir por Gram y observar al microscopio.
5. Sembrar en los medios e incubar a 37°C durante 48 hrs. las placas de Thayer Martín y Casman incubarlas en tensión parcial de CO₂.
6. Al terminar la incubación de los medios observar la morfología colonial y microscópica identificar la flora aislada de acuerdo a la metodología de la práctica

del grupo microbiano que corresponda y determinar la sensibilidad a los antibióticos, cuando sea necesario.

TECNICA: “Exudado Uretral”

Este estudio busca determinar el agente etiológico de uretritis, mediante estudios bacteriológicos directos y cultivo en medios selectivos. Antes de proceder a tomar la muestra, debe explicársele al paciente el procedimiento que se va a realizar, solicitándole la mayor colaboración de su parte. Indicarle al paciente que debe abstenerse de orinar al levantarse y que podrá hacerlo una vez que se practique la toma de muestra uretral.

- a. Debe retraerse el prepucio (si es necesario) y limpiar con gasa seca y estéril el meato urinario.
- b. Introducir el escobillón bacteriológico estéril, muy cuidadosamente, a través del meato urinario (aproximadamente 1 a 3 centímetros de profundidad).
- c. Una vez que se introduce el aplicador en la uretra, éste debe girarse 360°. Retirar el aplicador suavemente.
- d. Puede utilizarse el equipo comercial disponible para este procedimiento (Gen Probe®), provisto de aplicador y medio de cultivo de transporte.



1. La muestra se proporcionará en tubos de caldo tioglicolato.
2. Hacer frotis, teñir por Gram y observar el microscopio.
3. Sembrar en medios e incubar a 37°C durante 48 hrs. en los medios de cultivo de GC y Casman, incubar en atmósfera parcial de CO₂ (2-10%).
4. Al terminar la incubación de los medios utilizado, observar la morfología colonial: microscópica, identificar la flora aislada y sensibilidad a lo antibióticos.
5. Hacer las observaciones correspondientes, del crecimiento de cada una de las ajas. Dibujar los campos observados en el microscopio.
6. Identificar las colonias.
7. Hacer un reporte del resultado del paciente.
8. Sacar sus conclusiones

Diagrama de trabajo para el Cultivo de exudado Vaginal y Uretral.

| <u>Thayer-Martin</u> (Selectivo <i>N. gonorrhoeae</i>) | <u>Casman</u> (Para <i>Gardnerella</i> <i>Vaginalis</i>) | EMB (<i>Escherichia coli</i>) | Chapman (selectivo para <i>S. Aureus</i>) | Nickerson (Selectivo <i>Cándida albicans</i>) |
|--|--|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> •Observar colonias pequeñas. •Frotis con Gram Observar diplococos Gram negativos. •Hacer prueba de oxidasa con disco. (positiva) | <ul style="list-style-type: none"> •colonias muy pequeñas •Frotis con T. Gram: Cocobacilos Gram negativos. | <ul style="list-style-type: none"> •Frotis con T. Gram (Bacilos Gram neg.) •Enterobacterias | <ul style="list-style-type: none"> •Frotis con Gram (Gram neg.) •Prueba de coagulasa | <ul style="list-style-type: none"> • Tinción de Gram. (Levaduras Gram Positivas) •Prueba de filamento En suero. 0.1 ml de suero + suficiente colonias, incubar 3 hrs. 37°C, observar a en microscopio en objetivo seco, fuerte. |

Metodología recomendada para trabajar exudados vaginales.

PACIENTE EN POSICION GINECOLOGICA

OBTENCION DE LA MUESTRA

Mediante el uso de un espejo vaginal estéril lubricado con agua Estéril.
Se toma la muestra de la secreción de fondo de saco y cervix.
Los hisopos estériles se distribuyen.

MEDIR pH

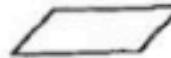


2SP

INMUNOFLUORESCENCIA



FROTIS DIRECTO
TINCION DE GRAM



TUBO CON
SOLUCION SALINA
ESTERIL

OBSERVACION EN
FRESCO DE:

TRICOMONAS
LEVADURAS
LEUCOCITOS
ERITROCITOS
CELULAS CLAVE



T-M



CAS

INCUBAR A 37°C
DURANTE 48 - 72 H EN
ATMOSFERA DE CO₂



S-110



EMB



GS

INCUBAR A 37°C
DURANTE 48 - 72 H



BIGGY

INCUBAR A
TEMPERATURA
AMBIENTE 24 - 72 H

2SP = Medio de transporte para Chlamydia trachomatis.
CAS = Medio de Casman con sangre de conejo al 5%.

T-M = Medio de Thayer-Martin

Metodología para identificar microorganismos encontrados en los exudados vaginales.

IDENTIFICACION MICROBIANA



CON BASE AL RESULTADO ANTERIOR



BIBLIOGRAFÍA:

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
7. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.
8. STESPICER, W.J.: *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª Ed.). Elsevier. 2009.
9. IOVINE –SELVA. El Laboratorio en la Clínica Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 992 y 993

Unidad VIII. INFECCIONES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Práctica No. 13. Coprocultivo

MATERIAL:

Placas de EMB ó MacConkey, SS, agar sulfito de bismuto, bilis-lactosa, Agar Verde brillante, Agar TCBS, XLD

Tubos con Caldo de tetrionato y caldo de selenita F

Tubos con agua peptonada pH 9.0 para enriquecimiento de vibrio cholerae

Juego de Pruebas Bioquímicas.

Material habitual para laboratorio de bacteriología.

Equipo de Tinción de Gram

Suero fisiológico

Yodo parasicológico.

Reactivo de oxidasa

Reactivo de kovac

Antisueros polivalentes

Se realiza el examen macroscópico de las heces, anotando su color, consistencia, la presencia de sangre, o el exceso de moco. La disentería bacilar produce típicamente una evacuación formada casi únicamente de moco, pus y sangre con muy pocas materias fecales. Pueden encontrarse fragmentos de tenia o lombrices. Los cambios de color pueden hacer pensar en melena, ictericia obstructiva, etc.

Debe examinarse al microscopio una emulsión poco espesa en suero fisiológico, buscando sangre, pus, huevos o quistes. (Para los estudios parasitológicos, véase la sección correspondiente.)

Primer día: a) Se siembra en un medio de MacConkey, XLD, Sulfito bismuto, TCBS.

b) Se siembra un fragmento pequeño (del tamaño de un guijarro) en medio de Caldo

De Tetrionato y selenito F.

c) con un hisopo o asa de platino pasar a un tubo con agua peptonada pH 9, 6.8 hrs.

A 37°C, posteriormente resembrar en una caja de TCBS e incubar 24 horas a 37°C observar y bucar las siguientes *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus*

Segundo día: e) Después de incubar toda la noche a 37°C, se observa las colonias en crecimiento y se identifican, etc. Las colonias que no fermentan la lactosa se pasan del medio SS., se seleccionan las colonias negras características de *Salmonella typhi* a un conjunto de cinco tubos para pruebas bioquímicas. Estos contienen, respectivamente, medio SIM, citrato de simmons, agar con urea, y agar de Kligler; el quinto tubo, pequeño, contiene un disco de gelatina con carbón en 1 ml de agua peptonada.

d) Se resiembra el caldo con selenita F en medio de cultivo de Verde brillante, XLD y sulfito bismuto.

Tercer día: e) Nótese el tipo de reacción en los cinco tubos. Muchos microorganismos se pueden identificar en esta etapa. Si las reacciones hacen pensar en *Salmonella* o *Shigella*, se lleva a cabo una prueba de aglutinación en portaobjetos, empleando antiseros polivalentes. Las reacciones positivas se deben reportar por teléfono, para aplicar medidas de aislamiento. Entre tanto, se resiembran los microorganismos en un conjunto de pruebas bioquímicas.

f) Los microorganismos del paso d, que no fermentan la lactosa, se siembran en un conjunto de cinco tubos.

Cuarto día: g) Se leen las reacciones de carbohidratos en los tubos preparados en e. Es posible ahora una identificación completa. En el caso de *Salmonella*, las reacciones típicas de azúcares confirman las sospechas despertadas por las reacciones serológicas del día anterior, y es posible llevar a cabo una identificación antigénica completa. Si las reacciones con azúcares no permiten establecer el diagnóstico, se vuelven a incubar estos tubos y se siembra otro conjunto de tubos con lisina, arginina y ornitina, buscando descarboxilasa. Debe inocularse también en tubo inclinado con fenilalanina; pueden ser útiles estudios auxiliares como las pruebas de oxidasa, del rojo de metilo y de Voges-Proskauer.

h) Se leen los cinco tubos del paso *f*. De ser necesario, se siembra en un conjunto de tubos con azúcares, como en *e*, y se continúa como en *g*.

BIBLIOGRAFÍA:

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECOSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
7. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.
8. STESPICER, W.J.: *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª Ed.). Elsevier. 2009.
9. IOVINE –SELVA. El Laboratorio en la Clínica Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 992 y 993

PRÁCTICA NO. 14

Determinación de Helicobacter pylori (Método de ELISA)

Prueba en Tira para la Detección Rápida Cualitativa de Anticuerpos Específicos de Helicobacter Pylori en Suero Humano

Para uso Profesional

USO DE LA PRUEBA

La prueba Bio-Pylori en presentación tira está diseñada para la detección rápida de flujo lateral, cromatográfica de inmunoensayo, cualitativa de anticuerpos específicos IgG en suero humano. Esta prueba esta diseñada como un auxiliar en el diagnóstico de la Infección causada por H. Pylori.

NO UTILICE PLASMA O MUESTRAS CONTENIENDO ANTICOAGULANTES QUE PUEDAN INTERFERIR EN LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La *Helicobacteria Pylori* está asociada con una variedad de enfermedades gastrointestinales tales como la úlcera estomacal, gastritis activa crónica y adenocarcinomas gástricos y duodenales (1,2,3,4,5,). La organización mundial de la Salud (WHO) ha declarado recientemente a la H. Pylori como carcinógeno Clase 1, declarado como un factor altamente riesgoso en el desarrollo de Cáncer de Estómago. Se ha reportado que un 50% de la población mundial está infectada de H. Pylori y un 40% de los casos son patogénicos. Los individuos infectados con H. Pylori desarrollan anticuerpos específicos y la detección de ellos es el principio utilizado en el diagnóstico de esta infección.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Esta prueba es de inmunoensayo cromatográfico de fluido lateral con doble antígeno. La prueba de H. Pylori contiene una membrana microporosa cubierta con antígenos de H. Pylori y oro coloidal conjugado unido molecularmente con antígenos H. Pylori. Existen 2 regiones en la prueba, una región de Prueba (Test) y una de control (C). Una línea de color rosado-rojizo aparecerá en el área de Test cuando los anticuerpos específicos IgG de H. Pylori estén presentes en la muestra. Si los anticuerpos no están presentes ó están presentes a niveles muy bajos, NO será visible la línea de Test. Sin embargo, una línea de color rosado-rojizo aparecerá siempre como resultado de un Control de Calidad interno en el desarrollo de la prueba.

MATERIAL SUMINISTRADO

1. Un equipo de Bio-Pylori contiene 25 Pruebas empacadas individualmente en un sobre metalizado con desecante.
2. Instructivo.

ALMACENAMIENTO

Almacene el producto a temperaturas entre (15° - 30°C). El producto es estable por 24 meses y la fecha de expiración aparece grabada en el sobre metalizado.

No congele el producto bajo riesgo de que los reactivos puedan dañarse. La exposición del producto a temperaturas mayores a 30°C acortará la fecha útil del producto. Por ejemplo: el exponer durante una semana el producto a 45°C reducirá la vida útil del producto a 10 semanas.

PRECAUCIONES

1. Para uso de diagnóstico In Vitro. Para uso profesional.
2. Se deberán tomar las precauciones de rutina apropiadas en la toma y manejo de muestras. Maneje las muestras y productos bajo preceptos Bio-peligrosos.
3. Utilice una prueba para cada muestra.
4. No utilice el producto después de su fecha de expiración que aparece en la caja.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

1. Siga los procedimientos rutinarios utilizados por su laboratorio par la toma de muestras de suero.
2. Las muestras de suero pueden ser almacenadas:
A) (20°C a 28°C) por 8 horas
B) (2°C a 8°C) por una semana
C) (-20°C) por tiempos prolongados
No se recomienda el congelamiento y descongelamiento continuo del suero.
3. A través de centrifugación deberán removerse cualquier tipo de sedimentos. Evite utilizar muestras turbias que puedan estar contaminadas con microorganismos.

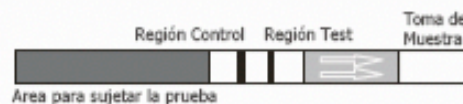
DESARROLLO DE LA PRUEBA

1. Las muestras refrigeradas y las pruebas deberán estar a TEMPERATURA AMBIENTE antes de ser utilizadas.
2. Abra el sobre metalizado hasta el momento de realizar la prueba. Identifique la prueba con nombre del paciente.
3. Agregue 50 microlitros (Una gota) de muestra de suero en la zona de Muestra.
4. Resultados altamente positivos aparecerán dentro de los primeros 5-10 minutos. Resultados débilmente positivos tardarán de 5 a 10 minutos. **NO INTERPRETE RESULTADOS DESPUÉS DE TRANSCURRIDOS 10 MINUTOS.**

INTERPRETACION DE RESULTADOS

POSITIVO:

Las líneas de Control "C" y de Test "T" están presentes en la ventana de resultados, indicando la presencia de H. Pylori en la muestra evaluada. En caso de aparecer en el área de test "T" una línea demasiado tenue, es indicativo que el resultado positivo se encuentra en niveles muy bajos por lo que se recomienda reevaluar la muestra bajo otro método confirmatorio.



NEGATIVO:

La línea de Control "C" estará presente en la ventana de resultados, indicando la NO presencia de *H. Pylori* en la muestra como indicativo de un resultado NEGATIVO.



INVALIDO:

Cuando no aparezca ningún tipo de líneas en el área de resultados "C" ni "T" después de transcurridos 10 minutos. Se recomienda utilizar otra prueba.

Otra opción para resultado inválido será la aparición de la línea de Test "T" sin que aparezca la línea de control "C".



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

La prueba contiene un control integrado en la línea de Control C, la cual indica que la prueba ha sido desarrollada correctamente, que ha sido utilizada la cantidad adecuada de muestra y que se ha llevado a cabo correctamente la absorción de muestra. En caso de que no aparezca la línea de Control después de transcurridos 5-10 minutos, el resultado será inválido por lo que se recomienda repetir la prueba.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. La prueba deberá correrse tal y como se indica en el presente instructivo sin desviaciones.
2. La interpretación de resultados deberá basarse acorde a los dibujos del presente instructivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Soll A.H., Patogénesis de úlcera péptica e implicaciones terapéuticas. *New Engl. J. Med.* 1990; 322:909-66.
2. Dixon, ME, *IV Helicobacter Pylori y Ulceración Péptica: Aspectos histopatológicos-* *Cos. H. Gastro. Hepa.* N1991, 6: 125-130.
3. O'Connr, HH., *Helicobacter Pylori y Cáncer Gástrico: Hipótesis.* *Eur. J. Gastro. Hepa.* 1992, 6: 103-109.
4. Lambert, J.R. and Marshall., B., *Bacilos Curvos no identificados en epitelio gástrico en gastritis crónica activa.* *Lancet* 1983, 1:1273-1275.

USO

La prueba rápida para la detección de antígenos de helicobacter pylori ensayo cualitativo por inmunocromatografía en muestras de heces fecales humanas. Los resultados arrojados en el ensayo son auxiliares en el diagnóstico por infección de helicobacter pylori es una referencia efectiva en el tratamiento y diagnóstico así como la erradicación de H. pylori. En pacientes con ulcera péptica.

INTRODUCCIÓN

La H. pylori es una bacteria en forma de espiral Gram. Negativo. Encontrándose principalmente en las capas de mucosa del estomago y del hígado respectivamente. La infección por H. pylori hoy es aceptada como una de las causas mas comunes para enfermedades como: gastritis, ulcera péptica, duodenal, adeno carcinoma gástrico y linfoma celular gástrico primario.

En el organismo es muy común la infección menos de la mitad de la población mundial a adquirido la infección típica por H. pylori durante la niñez. Una vez adquirida la infección persiste la cronicidad y continúa la probabilidad a través de la vida. El daño a la estructura gástrica y la función del estomago es constante y directa, aproximadamente uno de cada seis infectados por H. pylori se convierte en ulcera péptica y en pequeña proporción en cáncer gástrico.

La prueba de diagnostico para H. pylori pueden ser clasificadas en dos categorías: invasiva y no invasiva. El procedimiento de detección invasiva requiere una endoscopia y una biopsia del tejido de al mucosa estomacal. La presencia de H. pylori es confirmada por un cultivo directo, el examen histológico o una prueba de ureasa. La endoscopia y la biopsia de la muestra de tejido ofrecen la detección de la actividad de la infección por H. pylori. Aunque el procedimiento es de alta especificidad y sumamente exacto en la detección de positividad el costo y la incomodidad en los pacientes es muy alto. Por esto es mas extenso la viabilidad del procedimiento no invasivo y esto se basa en procedimiento serológico. Los ensayos para la detección serológica para los anticuerpos IgG en suero de pacientes con infección recurrente o anterior. El ensayo serológico es sumamente simple y muy conveniente ya que tiene una sensibilidad muy alta. Las limitaciones anteriores de los ensayos serológicos y la inhabilidad de distinguir infecciones actuales o pasadas. Los anticuerpos pueden estar presentes largo tiempo en sueros de pacientes después de una erradicación del organismo. La prueba de respiración de ureasa (UBT) es un ensayo no invasivo que se basa en la actividad de la ureasa en el organismo. La (UBT) detecta la actividad de la infección por H. pylori es de gran sensibilidad y alta especificidad. La (UBT) requiere una alta densidad y una gran actividad bacteriana y no debe realizarse sino hasta cuatro semanas después de alguna terapia hasta ver incrementado el número bacteriano y poder ser detectado por el método.

La prueba rápida de detección de antígenos H. pylori. Ensayo inmunocromatografico es un anticuerpo unido al cromógeno (oro coloidal) para la detección de la presencia de antígenos en heces humanas, la prueba es de detección directa de antígenos en fase activa. La prueba es sencilla y de fácil aplicación y los resultados pueden ser visibles para su interpretación en 15 minutos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba rápida de detección de antígenos se basa en el principio "sándwich" en fase sólida por inmunocromatografía. Para la aplicación de la prueba se toma una alicota diluida de heces y se tiene que agregar a la ranura del cassette (S). La muestra fluye a través de la tira que contiene los anticuerpos anti H. pylori asociados con el colorante rojizo de oro coloidal.

Si la muestra contiene antígenos H. pylori el antígeno se une al anticuerpo asociado al oro coloidal para formar el complejo antígeno-anticuerpo-oro coloidal. El movimiento de este complejo a través de la membrana de nitrocelulosa por acción de capilaridad hacia la región de la línea de prueba en la cual se encuentran los anticuerpos específicos inmovilizados. Como estos complejos reaccionan en la zona de prueba se verán atados los anticuerpos en la membrana formando una línea.

La segunda línea rojiza en la zona de control siempre debe aparecer en la ventana de resultados para que indique que el ensayo ha funcionado correctamente. Si los antígenos H. pylori no están presentes o están por debajo de los límites de detección de la prueba solo la línea de control debe estar visible. En caso de que la línea de control no se haga visible el ensayo se debe declarar inválido.

MATERIALES PROVISTOS

Cassette prueba rápida para la detección de antígenos H pylori. Cada cassette contiene: una tira de pruebas con anticuerpos específicos anti H. pylori en el área de prueba mas el cromógeno oro coloidal unido al anticuerpo sujetos ambos en la membrana de la tira.



Botella gotero: cada botella gotero contiene 1 ml. de buffer para la colección de muestras diluidas y aplicador.

MATERIALES NO PROVISTOS

1. Recolector y contenedor de muestras
2. Reloj.

PRECAUCIONES

1. Úsese exclusivamente para diagnostico in Vitro
2. Debe utilizar guantes protectores para manipular tanto la muestra como los componentes del kit.
3. La muestra de los pacientes y los controles positivos inactivos pueden contener agentes infecciosos y deben ser manipulados y desechados como agentes potencialmente contagiosos.
4. No se debe de usar los componentes del kit después de la fecha de expiración.
5. Desechar todos los materiales en un contenedor apropiado para material biológico infeccioso.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAJE

La fecha de expiración se indica en la etiqueta del empaque. Almacenar los tubos colectores y los dispositivos a temperatura ambiente.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

1. La muestra de los pacientes debe encontrarse en colectores que no contengan conservadores, suero de animales, detergentes o cualquier aditivo que pueda interferir con el ensayo.
2. Las muestras pueden ser almacenadas entre 2-8° C por tres días sin que intervengan con el resultado.
3. Para un almacenamiento a tiempo prolongado se deben congelar las muestras a una temperatura de -20° C
4. El repetitivo congelamiento y descongelamiento de la muestra puede interferir con el resultado.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Llevar a temperatura ambiente todos los reactivos incluyendo el cassette del ensayo antes de ser utilizado.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La cantidad de muestras de heces aplicadas es crítica a la sensibilidad del ensayo. Para proporcionar la conveniencia al usuario y asegurar la suficiente cantidad de la muestra que se aplicará se proporcionan dos tipos de métodos para la colección de muestras. Por favor leer el siguiente instructivo a detalle.
2. Utilizar el palillo de madera que se adjunta desatornille la botella de la muestra, utilice el palillo unido del aplicador unido en el casquillo para transferir el pedazo pequeño de muestra (5-6 milímetros de diámetro; aproximadamente 100 mg - 200 mg/0.1-0.2g) en la botella contenedora de muestra use el palillo de madera incluido.
3. Use el palillo de madera incluido si el espécimen fecal es flojo y difícil de tomar con el palillo del aplicador, utilice por favor el palillo de madera incluido para la muestra, y transfiera en el tubo de la colección de la muestra, deposite la muestra sacudiendo el palillo dentro del frasco colector de la muestra.
4. Ponga la tapa de la botella y apriete con seguridad, agite la muestra hasta mezclarla homogéneamente con el en la botella sacudiendo a fondo la botella por algunos segundos.

NOTA: muestras líquidas ó diarreicas no son apropiadas para este ensayo.

PROCEDIMIENTO

1. Llevar todos los reactivos y materiales a temperatura ambiente 8-30° C
2. Extraer el cassette de su empaque metalizado. Sostenga la botella de la muestra vertical con la extremidad apuntando en la dirección lejos del broche de presión de la extremidad de la prueba. Sostenga la botella de muestra en posición vertical sobre la ranura de muestra que se encuentra en el cassette, depositar tres gotas (120-150 µl.) de muestra diluida. Leer los resultados esperando entre 10-15 minutos, una muestra positiva franca puede mostrar resultados anteriores.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Resultados positivos. Una banda distintiva rosada aparecerá en la región "T" en adición a la línea que debe aparecer en la región de control "C" se considera positivo.

Resultado negativo. Al no apreciarse la aparición de ningún tipo de línea en la zona "T" y la aparición de la línea de control en la zona "C" el resultado se considera negativo.

Inválido. Al no aparecer la línea de control en la zona "C" después de haber esperado 15 min. De haberse agregado la muestra



CONTROL DE CALIDAD

La banda de control interno es un reactivo y un procedimiento de control. Con la aparición de esta línea se corrobora el buen funcionamiento del reactivo

Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso diario de materiales de control para la validación del funcionamiento de los materiales empleados.

LIMITACIONES

1. Este es un ensayo de detección cualitativo para antígenos H. pylori en heces fecales y no se debe utilizar como indicador cuantitativo.
2. La prueba es para uso exclusivo de diagnóstico in Vitro.
3. Los resultados obtenidos solo deben ser usados para la evaluación con pacientes que presenten síntomas de algún padecimiento gastrointestinal. El diagnóstico definitivo debe realizarse después de haber concluido el examen clónico de manera física.

BIBLIOGRAFIA

1. Soll A.H., Patogénesis de úlcera péptica e implicaciones terapéuticas. New Engl. J. Med. 1990; 322:909-66.
2. Dixon, ME, IV Helicobacter Pylori y Ulceración Péptica: Aspectos histopatológicos
3. Cos. H. Gastro. Hepa. N°1991, 6: 125-130.
4. O'Connr, HH., Helicobacter Pylori y Cáncer Gástrico: Hipótesis. Eur. J. Gastro. Hepa. 1992, 6: 103-109.
5. Lambert, J.R. and Marshall., B., Bacilos Curvos no identificados en epitelio gástrico en gastritis crónica activa. Lancet 1983, 1:1273-1275.

Distribuido por:
Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
01800-111-4343
www.grupomexlab.com

Rev. 07-2011

Unidad IX INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

PRÁCTICA No. 15. Cultivo de líquido cefalorraquídeo

En las meningitis purulentas el diagnóstico microbiológico se realiza, demostrando el agente etiológico en la muestra del líquido cefalorraquídeo la que debe ser tomada por el personal médico.

El líquido cefalorraquídeo se recoge en dos tubos de preferencia con tapón de hule, uno de ellos contendrá citrato de sodio 0.01 g. por cada 5 mL. de la muestra y de éste se hará el estudio citoquímico, mientras que el otro sin anticoagulante se emplea para hacer pruebas bacteriológicas.

El diagnóstico específico rápido, cuando se trata de *H. influenzae* o *S.pneumoniae*, se realiza con las reacciones de Quellung o por las pruebas de contrainmunoelectroforesis de inrnunofluorescencia directa o coaglutinación. La observación directa del frotis teñido por Gram o Giemsa permite dar un diagnóstico presuntivo.

MATERIAL:

Medio de Ruiz-castañeda

Placas con agar chocolate, placas con agar EMB.

Placas con agar sangre de carnero.

Portaobjetos.

Equipo para tinción de Gram.

Equipo para tinción de Ziehl-Nielsen.

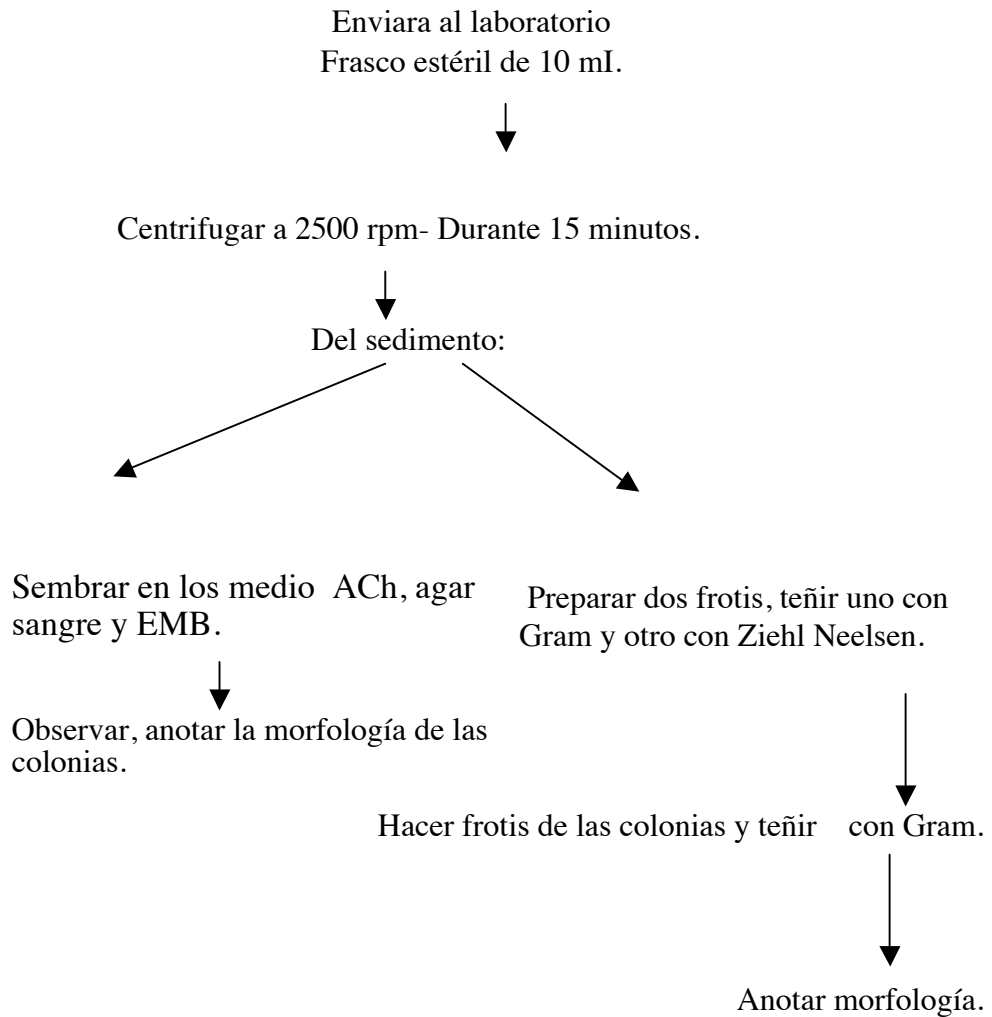
TÉCNICA:

1. El líquido cefalorraquídeo (LCR) debe ser manejado en condiciones de esterilidad, enviando la porción correspondiente al laboratorio clínico para el estudio citoquímico.
2. Centrifugar el LCR a 2500 rpm durante 15 minutos y descartar el sobrenadante.
 1. Hacer tres frotis: uno teñirlo por la técnica de Gram, el segundo por Ziehl Neelsen y el último por tinción negativa (para investigar la posible presencia de *Criptococcus neoformans* encapsulado, observarlos en objetivo de inmersión. El resultado se debe informar de inmediato.
 2. Realizar las pruebas de coagulación para *H. influenzae* y *S. pneumoniae* (si se cuenta con el equipo).
 3. Inocular en agar sangre, en agar chocolate enriquecido con los factores V y X para *Haemophilus*, en EMB; si hay sospecha clínica o los frotis indican la presencia de hongos, usar el medio Sabouraud y medio Lowestein-Jensen en caso de *Mycobacterium tuberculosis*. Incubar a 48 a 72 horas en atmósfera parcial de CO₂.
 4. Observar a las 24 horas (y diariamente a partir de entonces) en busca de crecimiento; si lo hay, hacer tinción de Gram y subcultivar en los medios apropiados después de interpretar el frotis. Es importante incluir en estas placas de sensibilidad a los antibióticos.
 5. Conservar en incubación los cultivos negativos de 72 a 96 horas antes de desecharlos.
 6. Inocular en medio de tioglicolato. Los cultivos anaeróbicos deberán mantenerse por lo menos de 7 a 10 días.
 7. La identificación final de los microorganismos aislados se hace empleando las pruebas bioquímicas o serológicas indicadas en cada caso.

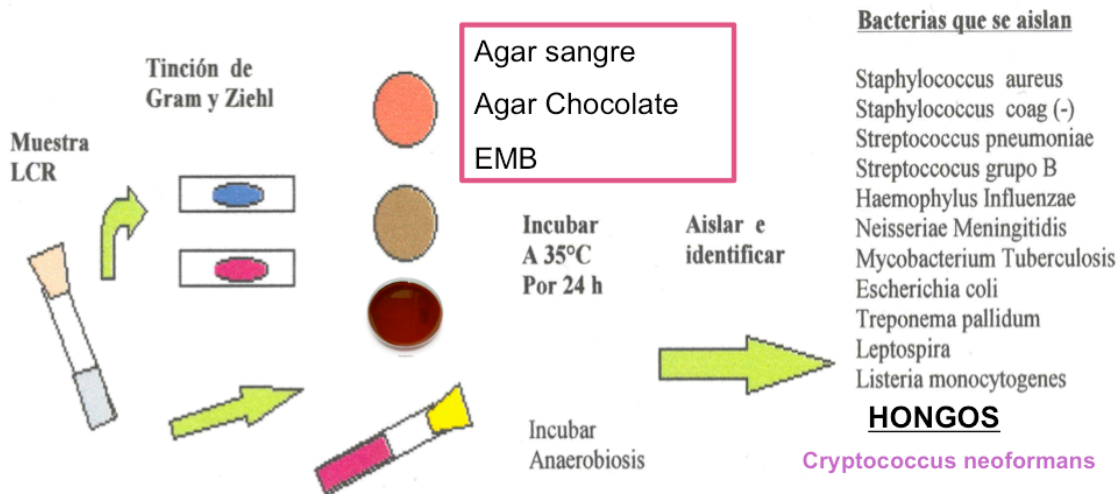
8. El líquido cefalorraquídeo normal es estéril.

La toma de muestra es llevada a cabo por médico especialista o Q.F.B. especialista en la columna vertebral (Con anestesia de Xilocaína local).

LCR es como agua de roca (transparente y cristalino). Cuando es anormal puede ser de aspecto: turbio, amarillento, algunas veces con eritrocitos.



PROCEDIMIENTO GENERAL PARA UN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.



BIBLIOGRAFÍA:

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
7. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.
8. STESPICER, W.J.: **Microbiología clínica y enfermedades infecciosas**. (2ª Ed.). Elsevier. 2009.
9. IOVINE –SELVA. El Laboratorio en la Clínica Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 992 y 993

Unidad X sistema hematopoyetico

GENERALIDADES

La sangre es un tejido estéril, por lo que la identificación de microorganismos contenidos en ella puede indicar tanto una bacteriemia transitoria como una septicemia.

Infecciones de la Sangre: Bacteremia pasajera, Bacteremia intermitente, Septicemia.

Signos y Síntomas: Malestar, Fiebre, Taquicardia, Hipotensión, Shock séptico.

Muestras: Sangre periférica

Diagnóstico bacteriológico: Los patrones clínicos de la bacteremia pueden ser pasajeros, intermitentes o crónicos. La bacteremia pasajera ocurre después de manipulación de tejidos infectados (abscesos, forúnculos, y celulitis). Instrumentación de superficies mucosas contaminadas POR: procedimientos dentales, cistoscopia, dilatación uretral , cateterización, aborto, y sigmoidoscopia.

Bacteremia también puede ocurrir en forma temprana en procesos infecciosos localizados y sistémicos , ha sido reportada en casos de meningitis, artritis piogénica, osteomielitis e infecciones gonocócicas y meningocócicas. Bacteremia intermitente asociada con abscesos no drenados de localización intraabdominal, pelvicos, hepáticos, prostáticos, etc. Bacteremia crónica es un signo importante de endocarditis infecciosa y otros focos de infección intravascular. Este ocurre en las semanas de infección aguda de fiebre tifoidea y brucelosis.

PRÁCTICA No. 16. Hemocultivo

El hemocultivo complementa urocultivos y cultivos de LCR en la evaluación de neonatos con sospecha de sepsis. Uno de los medios más utilizados es el Medio Bifásico de Ruiz – Castañeda. Las botellas deben observarse macroscópicamente a diario en busca de evidencia de desarrollo bacteriano por un total de 7 días.

HEMOCULTIVO POSITIVO

El desarrollo bacteriano se detecta por turbidez del medio de cultivo; colonias visibles en la capa sedimentada de sangre, o sobre ésta, hemólisis de la sangre, producción de gas. Cuando se obtiene un cultivo positivo se debe efectuar una tinción de Gram, que es particularmente útil para distinguir *Streptococcus* de *Staphylococcus*, o detectar la presencia de Bacilos Gram Negativos.

De los subcultivos se debe aislar e identificar la cepa con medios y pruebas diferenciales. Pruebas diferenciales de Género y especie, como son la catalasa y la coagulasa, para cocos Gram Positivos; o Sistema Bioquímico, para identificación de Enterobacterias, Prueba de Oxidasa, para diferenciar Bacilos Gram Negativos, etc.

ANTIBIOGRAMA

Subcultivos: una alícuota del caldo con desarrollo se siembra en un medio sólido, con incubación de 7 hrs ya hay crecimiento suficiente para ser utilizado como inóculo para las pruebas de sensibilidad.

Los organismos aislados de hemocultivos deben guardarse por algunas semanas en caso que se necesiten mayores estudios diagnósticos.

PRINCIPALES PATÓGENOS CAUSANTES DE BACTEREMIA

La bacteremia normalmente es causada por: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

La Sepsis se presenta principalmente en pacientes hospitalizados, y comunmente se desarrolla a partir de un sitio de infección primaria;

a) CULTIVOS NEGATIVOS.

Si todos los cultivos, subcultivos y frotis teñidos por Gram fueran Negativos, el cultivo de sangre puede informarse así:

No hubo desarrollo, ni aerobio, ni anaerobio, después de tres días de incubación.

Informe Final:

No hubo desarrollo después de 7 a 14 días de incubación.

b) CULTIVOS POSITIVOS.

Los patógenos encontrados más comúnmente en cultivos de sangre incluyen los siguientes:

Especies de *Bacteroides*, Especies de *Brucilla*, Bacilos Coniformes, *Filarias*, *Francisella tularensis*, *Haemophillus influenzae*, Especies de *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, Paludismo, *Meningococo*, *Gonococo*, *Rickettsias*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* especies, *Tripanosomas*, Bacilos Gram negativos: *E. coli*, especies de *Enterobacter*, especies de *Klebsiella*, etc.

MATERIAL

JERINGA DE 10 ml

GASA ESTERIL

SOLUCION DE YODO

ALCOHOL 70%

MEDIO BIFÁSICO DE RUIZ – CASTAÑEDA, PLACAS DE GELOSA SANGRE, EMB, AGAR CHOCOLATE, SAL Y MANITOL.

MATERIAL HABITUAL PARA LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

TÉCNICA:

1. Interrogar al paciente si se encuentra bajo tratamiento con antibióticos. Consignar esta información.

2. Seleccionar la zona que será puncionada para la extracción de sangre (Vena palpable).
3. Desinfectar alrededor la zona seleccionada.
4. Lavar cuidadosamente la región, con agua y jabón (remover el desinfectante).
5. Aplicar con gasa o algodón, una solución de yodo sobre el área seleccionada en forma concéntrica del centro hacia la periferia, y desechar el algodón o gasa utilizados.
6. Permitir la acción del yodo durante tres (3) a cinco (5) minutos. Remover completamente la solución de yodo con gasa o algodón estériles impregnados en alcohol de 70°. Realizar el procedimiento en forma concéntrica descartando siempre la torunda o gasa una vez se llega a la periferia de la zona de punción. Repetir este procedimiento cinco (5) veces.
7. No se debe tocar la piel con la mano una vez que el área ha sido desinfectada. Antes de hacer la punción venosa con aguja y jeringa de 10 mL estériles, palpar la vena utilizando guantes desechables y estériles, para proceder con seguridad.
8. En caso de utilizar recipientes comerciales de hemocultivos, seguir cuidadosamente las instrucciones de utilización del equipo de venoclisis que usualmente se incluye.
9. Una vez concluida la toma, debe reemplazarse la aguja con la cual se hizo la punción, por una aguja nueva estéril desechable con la cual se inyectará la muestra de sangre obtenida en los recipientes. Colocar las cantidades **necesarias de sangre** en los recipientes de hemocultivo, previa limpieza y desinfección de la zona de punción en la tapa de los mismos.
10. Mezclar suavemente los recipientes de hemocultivo. No agitarlos bruscamente y procurar que la sangre se impregne en todas las superficies de los medios de cultivo de los frascos.
11. Proceder con actividades propias del estudio (Rotulación, incubación 37°C, revisión diaria de cultivos, resiembras, interpretación de resultados, etc.).



BIBLIOGRAFÍA

1. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
3. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
4. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
5. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
6. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
7. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.
8. STESPICER, W.J.: *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª Ed.). Elsevier. 2009.
9. IOVINE –SELVA. El Laboratorio en la Clínica Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 992 y 993

UNIDAD X1. INFECCIONES DE LA PIEL: POR HERIDAS Y MULTISISTEMICAS

PRÁCTICA NO. 17. Cultivo de heridas.

Introducción

Existe una flora comensal cutánea residente y otra transitoria, es decir, el cuerpo humano no es estéril, hay bacterias sobre la piel y en las capas más profundas que corresponden, en general, a bacterias aeróbicas y anaeróbicas.

La flora cutánea residente es constante, de baja patogenicidad, no se asocia a infecciones, su composición depende del sitio anatómico correspondiente. En algunos sitios hay *Pseudomonas* y en otros algún tipo de *Staphylococcus epidermidis*.

Entre los agentes más comunes se identifican:

Aerobios

- *Staphylococcus coagulasa negativa.*
- *Corynebacterium SP.*
- *Micrococcus SP.*
- *Streptococcus viridans.*

Anaerobios

- *Peptostreptococcus.*
- *Propionibacterium.*

Todos estos microorganismos son de la flora residente, por lo que en general no son patogénicos.

Interpretación del cultivo

En general en Chile, los cultivos que se hacen son “cualitativos”. Los cultivos cuantitativos son de alto costo y deberían estar sólo indicados para las quemaduras infectadas, en donde la única solución para identificar el germen responsable es mediante un cultivo cuantitativo.

Flora cutánea transitoria

Existe una flora cutánea transitoria de la que habitualmente el equipo de salud es responsable (específicamente en el caso del *Staphylococcus aureus*) la que se transmite a través de las manos del personal. Se ha visto que los pacientes hospitalizados ya presentan colonización a los tres días, por lo que actualmente se da mucha importancia a acortar la duración de las hospitalizaciones.

El *Staphylococcus aureus* habitualmente se elimina con agua y por eso el lavado de manos tiene importancia para efectos de la prevención de infecciones intrahospitalarias.

Otros colonizadores de la piel son el *Streptococcus* Grupo A, enterobacterias, el *Acinetobacter*, y la *Pseudomona*, residente en la zona genital pero que en cierta

ocasiones puede encontrarse transitoriamente en otras zonas, por ejemplo en las úlceras venosas.

Colonización e infección

La colonización es la presencia y/o multiplicación de microorganismos patógenos sin respuesta clínica y/o inmunológica; es transitoria y no invasiva. Sin embargo, en algunas condiciones se puede transformar en patógena.

La infección es la presencia y/o multiplicación de microorganismos con respuesta clínica y/o inmunológica. En el caso del *Staphylococcus aureus*, el aumento en su número puede asociarse a presencia de sintomatología de infección.

Infección de heridas

Los pacientes portadores de una herida se pueden infectar por vía endógena u exógena. La vía endógena es la flora, la piel, la mucosa, el “*foco a distancia*”; por eso es importante que, cuando se realiza una cirugía electiva, el paciente no debe tener caries ni estar resfriado entre otras.

Participando de la vía exógena se encuentra el personal de salud, como primera línea. Los antisépticos también son elementos potencialmente altamente contaminados por el mal manejo de ellos, así como el instrumental que se utiliza en los pacientes.

La probabilidad de infección depende de la localización anatómica de la lesión; así, la extremidad inferior es más alta la probabilidad que la extremidad superior.

Los mecanismos de producción de una herida también tienen importancia, por ejemplo un trauma, una mordedura, una quemadura, un corte, una punción, una lesión vascular, una cirugía en general. La evolución de la herida será diferente dependiendo del cómo se produjo la misma.

El tipo morfológico de la lesión y las características del paciente son también elementos importantes a considerar. Mecanismos causales de infección pueden ser el estado inmunológico del paciente (si es inmunodeprimido), tratamientos con corticoides, con radioterapia o con largos períodos con antibióticos.

El estudio microbiológico permite confirmar la causa de la infección, orientar la terapia antimicrobiana, conocer el reservorio y la vía de infección, y determinar conducta clínica a seguir con el paciente.

Herida crónica o úlcera

La úlcera es una lesión cuya cicatrización es más tórpida. En este caso, la toma de muestra para cultivo es de un trozo de tejido con cureta, pinza o bisturí. Muchos microbiólogos y tecnólogos médicos que trabajan en microbiología no reciben muestras tomadas con tórula cuando deben informar una úlcera venosa, porque lo único que encuentran son gérmenes colonizadores.

En consecuencia, el cultivo de una úlcera en general se realiza con un trozo de tejido que no debe ser esfacelado ni necrótico para evitar la presencia de detritus y gérmenes muertos.

Toma de muestra

La toma de la muestra es el procedimiento mediante el cual se obtiene el tejido o fluido para estudio microbiológico. La calidad de la muestra debe ser confiable, y la interpretación del resultado del estudio microbiológico depende de la calidad de la muestra.

Normas generales. Se debe preparar el sitio de obtención lavando la herida con suero y por arrastre mecánico. Usar material estéril y técnica aséptica. El volumen de la muestra en general es pequeño; un trozo de tejido puede fluctuar entre 1 y 5 gramos (equivalente al tamaño de una lenteja). La muestra óptima consta de fluidos y tejido. La técnica óptima para tomar fluido es la punción y la aspiración. Si se emplean tórulas, se deben colocar en medio de transporte ya que el cuerpo humano tiene un gran porcentaje de agua, medio en el cual viven bacterias y gérmenes en general; si se envía una tórula seca, los microorganismos se mueren rápidamente. Las tórulas se deben colocar de inmediato en medio de transporte; si no es posible, enviar en tubo estéril con suero fisiológico antes de 30 minutos al laboratorio.

El cultivo Stuart es un medio de transporte que se utiliza en muestras que potencialmente contengan gérmenes aerobios. Una vez tomada la muestra, el tiempo de duración es de 24 horas a temperatura ambiente. No es necesario otro tipo de medidas como acercar a calor o frío.

No se deben tomar muestras de pus ya que éste contiene células muertas y el líquido acidifica rápidamente, provocando la muerte de todas las otras bacterias. Por lo tanto, es importante el arrastre antes de tomar el cultivo. Para el lavado se debe usar un suero tibio.

Uso de antibióticos

Antes, a los pacientes en tratamiento con antibióticos se les indicaba suspender el tratamiento por 48 horas, tomar la muestra, y reinstituir el tratamiento. Hoy en día se recomienda que el paciente continúe con el tratamiento antibiótico, pero lo fundamental es que el microbiólogo sepa qué antibiótico está tomando, en qué dosis y cuántos días.

Cultivo aeróbico

Se pueden clasificar los cultivos en aeróbicos y anaeróbicos, para cada uno hay medios de transporte distintos. Para los cultivos aeróbicos el medio es el Stuart.

El medio de cultivo Stuart contiene: agar-agar, un *buffer* y agua

Procedimiento para la toma de muestra

Si corresponde a una herida, se lava, se desliza la tórula humedecida sobre los bordes de ésta en forma de zig-zag (Figura 1) y se finaliza en la zona central.



Figura 1. Procedimiento toma de muestra.

Si la herida es profunda también se debe lavar, se toma la muestra de la parte más profunda.

En el caso de tomar un cultivo de úlcera, se debe lavar y extraer un trozo de tejido viable, es decir que no contenga tejido necrótico o esfacelado.

La toma de un trozo de tejido se puede realizar con curetas (Figura 1) utilizadas por los dentistas, que son bastante buenas para extraer trozos de tejido; también se puede utilizar una tijera de punta curva, un bisturí, o también pinza quirúrgica que le permitan raspar y sacar un trozo de tejido.

Algunas recomendaciones ya comentadas: arrastre mecánico previo a la toma de muestra; retiro de tejido esfacelado o necrótico; la tórula debe estar húmeda y el medio de transporte en buen estado (cerrado, sellado y estéril) y no debe estar un tiempo mayor de 24 horas, una vez tomada la muestra

Cultivo anaeróbico

El estándar nacional para tomar el cultivo anaeróbico es un “*caldo de cultivo*”. La diferencia con el medio de transporte es que tiene sustancias y elementos enriquecidos que permiten que el tiempo de duración de las bacterias sea más largo, serán cultivadas, y se seguirán reproduciendo. En cambio en el otro sólo se hace el transporte, sin permitir que las bacterias se reproduzcan.

El caldo de cultivo llamado tioglicolato, es el que se utiliza en los hemocultivos, corresponde a sustancias reductoras.

El cultivo anaeróbico se puede adquirir de varias formas. Una forma es mediante la toma de un trozo de tejido por lavado al igual que el cultivo aerobio. Así, se obtiene un tejido viable y se coloca en tioglicolato. Otra manera es la extracción de líquido con una jeringa. También se puede obtener la muestra con una tórula humedecida en la zona más profunda de la lesión.

Para que sea efectivo, el caldo de cultivo debe estar sellado al vacío ya que los anaerobios viven en un medio sin oxígeno. Al abrir la tapa ingresa el oxígeno, por lo que la toma de muestra se puede hacer en forma conjunta. Por ejemplo, si se tiene un trozo de tejido, éste se frota por las paredes del frasco.

En el caso de un absceso (Figura 2a), idealmente se punciona el absceso con una jeringa y lo extraído se transporta en tioglicolato. Si no hay medio de transporte, la misma jeringa se envía al laboratorio, antes de 30 minutos.

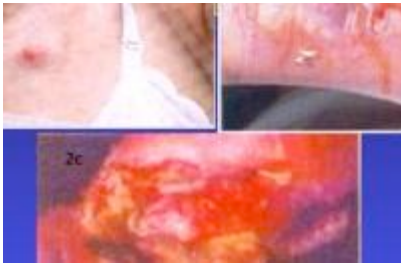


Figura 2. 2a absceso. 2b celulitis o flegmón.
2c herida con compromiso óseo.

En las celulitis o flegmones (Figura 2b), en que habitualmente no es posible extraer nada por punción, se recomienda que se limpie la zona de igual forma que en los abscesos, y se utiliza una jeringa y una aguja que dependerá de la zona a puncionar y la edad del paciente. Se inyecta solución fisiológica (en niños menores de 2 años se utiliza agua bidestilada y en mayores de 2 años entre 0,5 y 1 cc de solución fisiológica), y sin retirar la aguja se aspira para hacer un barrido. Este procedimiento se debe realizar en cantidades pequeñas ya que de lo contrario se corre el riesgo de expandir las bacterias.

La orden médica debe indicar el nombre del paciente, el número de la ficha clínica, la identificación del establecimiento, el tipo de cultivo (aerobio, anaerobio o combinado), ubicación anatómica del cultivo, la fecha y la hora de la toma de muestra, la identificación del médico solicitante, el diagnóstico clínico, y si el paciente está o no en tratamiento con antimicrobianos. El rótulo del tubo debe contener: nombre del paciente, número de ficha clínica, el tipo de muestra, la fecha y hora de su obtención. Estas son las recomendaciones desde el punto de vista microbiológico que solicitan para que la evaluación se realice de manera óptima.

MATERIAL

JERINGA DE 10 ml

GASA ESTERIL

SOLUCION DE YODO

ALCOHOL 70%

CALDO DE TIOGLICOLATO, PLACAS DE GELOSA SANGRE, EMB, AGAR CHOCOLATE, SAL Y MANITOL, AGAR DEXTROSA SABOURAUD, AGAR MYCOSEL.

MATERIAL HABITUAL PARA LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

TÉCNICA:

1. Interrogar al paciente si se encuentra bajo tratamiento con antibióticos. Consignar esta información.
2. Seleccionar la zona de la piel a estudiar.
3. Desinfectar alrededor la zona seleccionada.
4. Lavar cuidadosamente la región, con agua y jabón (remover el desinfectante).
5. Inocular en los medios correspondientes. Seguir la indicaciones del maestro.

Protocolo de trabajo para cultivo de heridas.

El cultivo de muestras de heridas, abscesos y tejidos blandos se realiza para detectar bacterias que sean agentes causales de infección.

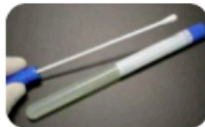
TOMA DE MUESTRA

Hisopados de heridas superficiales



Enjuagar con solución salina estéril.

Rotar la superficie del hisopo aprox. 5 veces



Colocar el hisopo en **MEDIO DE TRANSPORTE STUART**

Abscesos cerrados.

Desinfectar con clorhexidina al 2%



Aspirar con jeringa y colocar en un contenedor estéril

Biopsias y tejido



Se colectan de áreas de la lesión o adyacentes a la lesión

NOTA: Evitar la toma de muestra con hisopos si se pueden tomar aspirados o biopsias.

NOTA 2: No refrigerar o incubar las muestras.

NOTA 3: No se aceptan muestras con formol

MEDIOS DE CULTIVO NECESARIOS

Agar Sangre



Agar Sal y Manitol



Agar Chocolate



Agar EMB



Agar Yema de Huevo



Agar DS

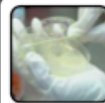


CALDO TIOLICOLATO
para anaerobios de tejidos y aspirados

PROCEDIMIENTO



Sacar las placas de cultivo del refrigerador y dejar atemperar.



Inocular los medios de cultivo con la muestra obtenida.



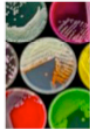
Incubar las placas de cultivo en las condiciones necesarias.

EXAMEN DIRECTO DE LA MUESTRA

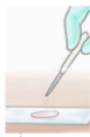


Tinción Gram y reportar lo observado bajo el microscopio.

POSTERIOR A LA INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



Analizar la morfología colonial y comparar con la teoría.



Realizar tinción Gram de colonias características.



Realizar pruebas confirmatorias de identificación.

CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Agar Sangre

| | |
|---|-----------------------------------|
| Colonias pequeñas, de color blanco o grisáceo. Hemólisis beta o alfa | <i>Streptococcus</i> (No grupo D) |
| Colonias grisáceas pequeñas, aunque más grandes que las de estreptococos grupo A. Hemólisis alfa, en raras ocasiones beta | <i>Enterococcus</i> (Grupo D) |
| Colonias grandes, de color entre blanco y gris o entre crema y amarillo, con o sin hemólisis | <i>Staphylococcus</i> |
| Colonias de pequeño o gran tamaño, color entre blanco y gris o amarillo, con o sin hemólisis | <i>Corynebacteria</i> |
| Colonias de pequeño a mediano tamaño, grisáceas, con débil hemólisis beta | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Colonias de mediano a gran tamaño, de color gris, con o sin hemólisis | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Pequeñas colonias blancas | <i>Candida spp</i> |

Agar Sal y Manitol

| Cepas | Resultados de crecimiento |
|--|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | Colonias amarillas de tamaño mediano, amarillo medio. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | Colonias amarillas de tamaño mediano, amarillo medio. |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | Colonias blancas de tamaño pequeño a mediano, rojo mediano. |

Agar Chocolate

| | |
|---|---------------------------------|
| Pequeñas, húmedas, nacaradas con un olor de ratón característico | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| Pequeñas de color blanco grisáceo a incoloro, mucoides | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| Medianas a grandes, gris azulado, mucoides | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| Colonias pequeñas, planas o más grandes, mucoides verdosas, las colonias circundantes pueden ser verdosas | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |

Agar EMB

| | |
|--|----------------------------------|
| Colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico | <i>Escherichia coli</i> |
| Colonias grandes, mucoides, color negro azulado | <i>Enterobacter / Klebsiella</i> |
| Colonias grandes, incoloras | <i>Proteus</i> |
| Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar | <i>Salmonella / Shigella</i> |
| Colonias irregulares, incoloras | <i>Pseudomonas</i> |

BIBLIOGRAFIA

1. Básicas

10. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas 6/ed. Panamericana. 2008
11. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana. 2009
12. TAY ZAVALA JORGE. Microbiología y Parasitología Medica, Ed. 3ª Edit. Méndez Editores, México D.F. 2003.
13. COWAN, SAMUEL TERTIRUS. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica, Edit. CECSA, México D.F.
14. JAWETZ, ERNEST. Manual de Microbiología Medica, Edit. Manual Moderno, México D.F.
15. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. H.: Microbiología Médica. (6ª Ed.) Elsevier, 2009.
16. ROMERO CABELLO RAUL. Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, México D.F. 2000.
17. STESPICER, W.J.: *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª Ed.). Elsevier. 2009
18. Manual de Bacteriología Medica IPN 1995
19. Steve K. Alexander Atlas de Microbiología Editorial Benjamín Cummings 2001
20. NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
21. Diario Oficial. Jueves 1º de noviembre de 2001. 1ª sección. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.

2. Complementarias

1. Kingsbury David t, Manual de Microbiología, Vol. 2, grupo Noriega editores, México 1997
2. Smith y Wood, Biología Molecular y Biotecnología, adison-Wesley, Edit. Iberoamericana. Mexico 1998.
3. Wiliams W, Manual Bergey de Bacteriología 1999
4. Austin P. Taxonomía Bacteriana Moderna Edit. Grupo Noriega. México 1995
5. P. García, Microbiología Clínica Aplicada Edit. Díaz Santos S.A. Qr46637 (USBI) México 1998
6. C.H. Collins, Métodos Microbiologicos edit. Acribia, México 1997
7. Atlas B.M. Microbiología Fundamentos y Aplicaciones, Edit. CECSA; México 1991
8. Revista latinoamericana de Microbiología 2012

ANEXO A. Técnicas de Tinción

1 Tinción de Gram

Gram, bacteriólogo dinamarqués, descubrió en 1884, que algunos gérmenes (Gram positivos) contienen ciertos elementos químicos en gran cantidad, peptidoglicano, en su membrana dispuestos estructuralmente en forma muy diferente a la de otros (Gram negativos) y forman con los colorantes derivados de la rosanilina (violeta de genciana, cristal violeta) más el yodo, un compuesto que resiste la acción de decolorantes (alcohol absoluto, alcohol acetona).

En consecuencia aplicando éste método de coloración diferencial los gérmenes que contienen esos elementos químicos quedan coloreados violeta y se denominan Gram positivos, aquellos que los contienen en pequeña cantidad se decoloran y para observarlos es necesario teñirlos nuevamente, para este fin se utilizan colorantes como la fucsina y la safranina y se denominan Gram negativos.

MATERIAL:

Porta objetos

Asa de platino

Equipo de tinción de Gram

Muestra Clínica (exudado Nasal, faríngeo, u ótico)

TECNICA:

1. Se toma una pequeña alicuota de la muestra.
2. Se realiza una extensión en un portaobjetos limpio y desengrasado.
3. Dejar secar el frotis. Y fijarlo por calor.
4. Colocar en una varilla de tinción; y agregar Cristal Violeta y dejar actuar por 1 a 2 minutos.
5. Enjuagar al chorro de agua.
6. Agregar la solución de Yodo-Lugo. Y dejar actuar por 30 segundos.
7. Enjuagar al chorro de agua.
8. Decolorar con alcohol-cetona durante 30 segundos.
9. Enjuagar al chorro de agua.
10. Agregar safranina y dejar por 15 a 20 segundos.
11. Enjuagar al chorro de agua.
12. Dejar secar al aire libre, o colocar el frotis en un papel absorbente.

13. Agregar una gota de aceite de inmersión.
14. Observar al microscopio en objetivo 10x para observar el campo y pasar a objetivo de 100x sin pasar por objetivo 40X.

2 Tinción de Zielh Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen demuestra la capacidad que tienen algunas bacterias teñidas de resistir a la decoloración por ácidos y alcoholes. Esta propiedad de algunas micobacterias y actinomicetos se correlaciona con el alto contenido en lípidos de su envoltura celular, que confiere un ambiente muy hidrófobo. Además, estos grupos poseen unos lípidos característicos llamados ácidos micólicos que aumentan este carácter hidrófobo.

MATERIAL:

Porta objetos
Asa de platino
Muestra de Espectoración
Equipo de tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción Ziehl-Neelsen requiere tres colorantes:

1. Mezcla de fucsina-fenol: capaz de teñir las células en caliente. El fenol facilita la penetración de la fucsina en la envoltura celular.
2. Decolorante orgánico: mezcla de ácido y alcohol.
3. Colorante de contraste: azul de metileno.

Las bacterias ácido-alcohol resistentes, tras la unión de la fucsina, resisten el tratamiento orgánico y se verán teñidas de rosa. El resto de las bacterias se decolorarán y se contrastarán con el azul de metileno.

1. Prepara un frotis con la muestra.
2. Cubrir completamente con carbolfucsina la preparación.
3. Calentar la preparación cuidadosamente en un mechero Bunsen (puede ser a baño maría, o bien en plancha eléctrica), sin que hierva la muestra durante 5 min.
También puede utilizarse una parrilla eléctrica, o calentar en vapores de baño maría.
Nota: añadir más carbolfucsina conforme ésta se evapora; la preparación no debe quedar seca en ningún momento.
4. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
5. Decolorar con la solución ácido-alcohol hasta que la muestra adopte un color rosa claro (unos 30 seg.)
6. Lavar con agua para detener la decoloración.

7. Teñir con azul de metileno 1 min.
8. Lavar con agua el exceso de colorante.
9. Secar la preparación.
10. Examinar al microscopio. Anotar las diferencias existentes entre los dos grupos bacterianos.

3 Tinción Negativa. Método de Gin.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Tinta china
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Puente de tinción

REACTIVOS:

- Agua destilada
- Azul de metileno
- Aceite de inmersión

MATERIAL BIOLÓGICO:

TÉCNICA:

- 1.- En un portaobjetos mezclar una gota de agua y una gota de tinta china.
- 2.- Añadir una asada de la bacteria y hacer una suspensión con la mezcla.
- 3.- Extender la suspensión suavemente por el portaobjetos.
- 4.- Secar al aire el frotis. No fijar a la llama.
- 5.- Contrateñir con azul de metileno.
- 6.- Lavar con agua corriente y dejar secar. Observar con aceite de inmersión.

INTERPRETACIÓN:

Las cápsulas se observan transparentes en un fondo negro y el cuerpo de la bacteria se observa de color azul.

4 Método de Hiss

MATERIAL Y EQUIPO:

- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Puente de tinción

REACTIVOS:

- Azul de metileno
- Sulfato de cobre al 20%
- Aceite de inmersión

MATERIAL BIOLÓGICO:

TÉCNICA:

- 1.- Realizar un frotis.
- 2.- Teñir con azul de metileno durante un minuto.
- 3.- Lavar con agua corriente.
- 4.- Lavar con la solución de sulfato de cobre al 20%.
- 5.- Dejar secar y observar con aceite de inmersión.
- 6.- Anotar observaciones.

INTERPRETACIÓN: Las cápsulas se observan de un ligero color café.

5 Método de Schaeffer – Fulton

MATERIAL Y EQUIPO:

- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen y lámpara de alcohol
- Microscopio

REACTIVOS:

- Aceite de inmersión
 - Verde de malaquita
 - Safranina
 - Desinfectante
-
- Puente de tinción

MATERIAL BIOLÓGICO:

1. Teñir con verde de malaquita.
- 2.- Calentar hasta emisión de vapores de 3 a 5 minutos.
- 3.- Lavar con agua corriente durante 30 segundos.
- 4.- Contrateñir con safranina durante 1 minuto.

5.- Lavar con agua corriente y dejar secar.

6.- Observar con aceite de inmersión.

INTERPRETACIÓN: Las esporas se observan como una estructura de color verde en el centro o en la orilla de la bacteria.

ANEXO B: Medios de Cultivos

Agar Cled

(Cistina-Lactosa-Deficiente en electrolitos)

Cal. 232.1 450 g

Para cultivar gérmenes Gram positivos y Gram negativos en infecciones urinarias.

Para el desarrollo y el recuento en bacteriología urinaria de gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Impide el swarming ael Proteus.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|---------------------|-------|
| Peptona de Caseína | 4.0 |
| Extracto de Carne | 3.0 |
| Peplona de Gelatina | 4.0 |
| Lactosa | 10.0 |
| L-Cistina | 0.128 |
| Azul de Bromotimol | 0.02 |
| Agar | 15.0 |

pH tinal 7.3 I.. 0.2

Preparación:

Suspender 36.0 g en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar lentamente agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto y esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Vaciar en cajas de Petri. Una vez solidificado. invertir las placas para evitar el exceso de humedad.

Usos:

En el medio CLED (Cistina-Lactosa-deficiente en electrolitos) crecen profusa mente la gran mayoría de las bacterias que provocan infecciones urinarias pudiéndose diferenciar o identificar sus colonias respectivas. Tiene además la ventaja de impedir la difusión del Proteus en la superficie del medio. lo que echaría a perder la prueba. La presencia de bacterias contaminantes como difteroides, lactobacilos y otros microbios. nos indica con qué tanto cuidado fue tomada la muestra de orina en estudio.

Los cultivos urinarios deberán realizarse con la primera muestra matutina y previo aseo escrupuloso de las zonas genital es. Utilicese el volumen medio de la misma para que la primera porción del chorro arrastre a los microorganismos estacionados normalmente en la uretra.

Los microorganismos que provocan infecciones en las vías urinarias son por lo general abundantes y de una sola especie. El col íbacilo es el germen que se aísla con mayor frecuencia.

La siembra de la muestra puede hacerse por el método de las diluciones o por estría sobre la superficie del agar con asa calibrada. Efectuar los recuentos de colonias después de 18 horas de incubación a 35°C. Reportar el número de ellas como colonias o bacterias por mi de orina. Recordar que un número de 100,000 (10)⁵ o más ya tiene un gran significado clínico para considerarse como un? infección en vías urinarias.

Bibliografía:

Bebis T.D.J. Med. Lab. Technol. 26:38-41, 1968. Mackey, J.P. y Sandys, G.H. 1965 8.M.H. 1 1173. Mackey, J.P. y Sandys, G.H.. 1966 8.M.J. 1 1173. Guttman, D y Nayler G.R.E. 1967 8.M.J. 2 343-345.

Agar de Czapek Dox

Cal. 251-1 450 g

Para cultivar hongos y promover la formación de Clamidosporas.

Ampliamente usado en Microbiología de suelos para cultivar hongos y bacterias del mismo, así como en la formación de Clamidosporas por *Candida albicans*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|-------|
| Sacarosa | 30.0 |
| Nitrato de Sodio Fosfato | 3.0 |
| Dipotásico Sulfato de | 1.0 |
| Magnesio Cloruro de | 0.50 |
| Potasio Sulfato Ferroso | 0.50 |
| Agar | 0.01 |
| | 15.00 |

pH final 7.3 I.. 0.2

>:reparación:

Suspender 50 g del polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir hasta disolución completa del material (aproximadamente un minuto). Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Mezcle muy bien antes de vaciarlo en tubos o en cajas de Petri, (12 mi por caja). Deje que los tubos solidifiquen en posición inclinada. Si se requiere bajar el pH a 3.5, agregue 10 mi de ácido láctico al 10% por litro de medio después de la esterilización. El Agar de Czapek Dox es un medio semisintético que contiene nitrato de sodio como la única fuente de nitrógeno y es uno de los medios sólidos más útiles (Jara el cultivo de hongos en general, especialmente saprófitos y fitopatógenos.

Técnica general para el cultivo de hongos:

Evitar la humedad excesiva del medio. Para ello vaciar el agar fundido enfriado entre 45 - 50°C, un volumen de más o menos 12 mi por caja de Petri desechable de 9 cm de

| MICROORGANISMOS | CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Grandes, amarillas elevadas, opacas, con el centro ligeramente más obscuro. Agar amarillo |
| Enterobacter | Semejantes a <i>E. coli</i> pero mucosas y de mayor tamaño. Agar amarillo. |
| Klebsiellas | Grandes amarillas o blanco amarillentas. Sumamente mucosas y elevadas. Pueden presentar una ligera tonalidad azulada. Agar amarillo. |
| Proteus | Azules, translúcidas con bordes irregulares. Poco elevadas. |
| Pseudomonas | Verde azuladas pálidas. Con superficie mate típica y contornos irregulares. Olor "dulzón". Agar azul verdoso. |
| Salmonella, Shigella. Serratia, Providencia. | Desde azules hasta azul intenso. |
| <i>Streptococcus fecalis</i> . | Muy pequeñas, de 0.4 mm. amarillas, opacas. Agar amarillo. |
| Estafilococos | Pequeñas de color amarillo intenso, opacas. Agar amarillo. |
| Corinebacterias | Muy pequeñas, grises. |

Agar Anaeróbico

Para cultivar anaerobios y efectuar pruebas de sensibilidad a los mismos.

Medio de cultivo desarrollado por Brewer para cultivar microorganismos anaeróbicos, como *Clostridium*, sin necesidad de recurrir a recipientes (jarras) para anaerobiosis. También se usa para pruebas de sensibilidad de los mismos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--|-------|
| Peptona de Caseína | 17.5 |
| Peptona de Soya | 2.5 |
| Cloruro de Sodio | 2.5 |
| L.Cislina | 0.4 |
| Dextrosa | 10.0 |
| Agar | 15.0 |
| Tioglicolato de Sodio | 2.0 |
| Formaldehído Sulfoxilato de Sodio Azul de Metileno | 1.0 |
| | 0.002 |

pH tinal 7.2 ± 0.2

Preparación:

Suspender 51 g de polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien y calentar agitando continuamente. Hervir por un minuto o hasta que el medio se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 15 libras durante 15 minutos. Vaciar en -cajas de Petri a las 3/4 partes de su capacidad, para obtener así capas más gruesas que las usuales. Una vez que el medio haya solidificado, depositar sobre él, la tapa de Brewer especial para anaerobiosis. La tapa de Brewer permite el desarrollo en la superficie de gérmenes anaerobios estrictos y microaerófilos, en atmósfera normal.

Usos:

Los tres agentes reductores provocan un descenso marcado y bastante estable del potencial del óxido-reducción, asegurando así buenas condiciones de anaerobiosis. El azul de metileno funciona como indicador Redox.

La siembra de la muestra (clínica o alimento) puede practicarse por estría superficial o por vaciado, es decir, inoculando y mezclando el producto eQ estudio con el medio fundido y enfriado entre 45 y 50°C. Casi nunca deberá calentarse la muestra para destruir las formas vegetativas porque serían destruidos los anaerobios no esporógenos. Sin embargo, a veces es conveniente hacerlo cuando se trata de microorganismos formadores de esporas como *Clostridium*, menos con *Clostridium perfringens* que muy pocas veces las forma. Cuando esté indicado el calentamiento, calentar la muestra suspendida en líquido dilu

vente (agua peptonada, solución amortiguadora de fosfatos), durante 10 minutos entre 70 y 80°C.

Una vez fría la suspensión, inocular 2 placas de Agar Anaeróbico e incubar una de ellas en anaerobiosis y atmósfera de CO₂ a 35°C durante 18 a 48 horas y la otra también en anaerobiosis pero sin CO₂. Se obtienen mejores resultados utilizando "jarras anaeróbicas" más CO₂ que con la sola anaerobiosis sin di óxido de Carbono.

Las placas de Agar Anaeróbico también pueden incubarse en atmósfera normal cubriendo la superficie del medio de cultivo con las tapas de Brewer. En este caso, dejar sin sembrar la franja circular externa del medio, como de 1.5 cm de ancho. Sobre esta franja estéril se aplicará con más o menos firmeza, el reborde interno de la tapa Brewer para obtener un sello hermético. La parte central de la tapa no deberá tocar ningún punto del medio de cultivo a fin de dejar una pequeña cámara de aire como de 5 a 2 mm de altura. Cuando se observe crecimiento, abrir las placas para seleccionar las colonias, pudiendo incubarlas después más tiempo, si es preciso.

A los medios de cultivo para anaerobios, si no han sido preparados poco antes de su uso, es muy conveniente calentarlos y fundirlos para expulsarles el oxígeno disuelto.

Si por alguna circunstancia no es posible hacer la siembra del material en estudio en el Agar Anaeróbico, sembrar la muestra en Medio de Tioglicolato sin Indicador (Bioxon 245-1), previamente calentado y enfriado. Incubar hasta el día siguiente y resembrar en el Agar Anaeróbico. El Medio de Tioglicolato sin indicador es un excelente caldo de enriquecimiento y con frecuencia da mejor resultado que la siembra directa en placas.

Si la muestra en estudio contiene una mezcla de gérmenes diferentes para aislar anaerobios, colocar un disco de papel filtro impregnado con 30 mcg de kanamicina en el área de inoculación masiva de una placa de Agar Anaeróbico adicionada con un 5 % de sangre desfibrinada estéril de borrego o de conejo, y un disco de 10 unidades de bacitracina en otra placa de Agar Sangre. Dichos antibióticos inhibirán a los gérmenes aerobios en la zona inmediata a su alrededor pero no a los microorganismos anaerobios.

Para llevar a cabo pruebas de sensibilidad (con gérmenes anaeróbicos), proceder de la siguiente manera:

1. Inocular el cultivo puro sobre la superficie del agar (capa inferior).
2. Depositar de 4 a 5 discos de papel impregnado con los antibióticos en estudio. No probar más discos porque los

halos de inhibición son bastante grandes y pueden entrecruzarse.

3. Recubrir cuidadosamente el inóculo y los discos con otra capa (capa superior) del mismo medio de cultivo (Agar Anaeróbico, Bioxon 270-1).
4. Una vez solidificado el medio, colocar la tapa anaeróbica de Brewer (sobre la capa superior) e incubar aeróbicamente, o bien, en anaerobiosis si se emplea la tapa normal de la caja Petri.

Bibliografía:

Brewer. S.Cience. 95:587. 1942.

Agar Biggy

Para aislamiento e identificación de *Candida*.

Cato 205-1

450 9

El Agar de Glicina, Glucosa, Levadura y Sulfito de Bismuto es útil para el aislamiento y la identificación presuntiva de *Candida* por medio de la reacción de sulfuro.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------------|------|
| Citrato de Amonio y Bismuto | 5.0 |
| Sulfito de Sodio | 3.0 |
| Dextrosa | 10.0 |
| Glicina | 10.0 |
| Extracto de Levadura | 1.0 |
| Agar | 16.0 |

pH final 6.8 ± 0.2

Preparación:

Suspender 45 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante no más de un minuto. Dejar enfriar a 45 - 50°C.

Agitar circularmente y vaciar en placas de Petri estériles, utilizando aproximadamente 20 ml para cada placa. *No esterilizar en autoclave.*

Usos:

El Agar Biggy es útil para aislar *C. albicans* y *C. tropicalis* y para la diferenciación de especies en la forma siguiente según Nickerson:

C. albicans

Colonias lisas, hemisféricas o circulares, ca

Agar de Bilis Verde Brillante

Cal. 124.1

450 9

Para determinar el grado de contaminación causada por gérmenes del grupo coliforme en aguas de uso común, potables y de drenaje.

Fórmula aproximada:

| | |
|--------------------------|----------|
| Peplona de Gelatina | 8.250 g |
| Laetosa | 1.900 g |
| Agar Especial | 10.150 g |
| Sulfito de Sodio Fuseina | 0.205 g |
| Básica Erioglaucina | 77.6 mg |
| Cloruro Férrico Fosfalo | 64.9 mg |
| Monopotásio Bilis de | 29.5 mg |
| Buey | 15.3 mg |
| Verde Brillante | 2.95 mg |
| | 29.5 mg |

pH final 6.9 i 0.2

Preparación:

Suspender 20.6 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada de buena calidad. Dejar en reposo de 5 a 10 minutos para que el agar se hidrate correctamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Dejar enfriar entre 45 a 50°C y distribuir en cajas de Petri o en otros recipientes apropiados.

Usos:

Puede emplearse para apreciar el grado de contaminación de muestras de aguas, de diversos alimentos así como de otros materiales. Para el recuento de bacterias coliformes deberán emplearse diluciones de la muestra, que den cuando menos un número de 10 a 50 colonias por placa, utilizando la técnica del vaciado. Es decir, practicar siembras de varias diluciones del material en estudio en el medio fundido, mezclar y vaciar en sus placas respectivas. Una vez sembradas éstas, incubarlas entre 35 a 37 ° C de 17 a 19 horas.

Las colonias de coliformes presentan una zona central roja intensa rodeadas de un borde de color rosa, destacándose nítidamente del fondo azul oscuro del medio de cultivo.

El medio es sensible a la luz lo que le provoca una disminución en la efectividad y en el color del mismo, pasando del azul fuerte al púrpura o al rosado. Se recomienda que el medio se prepare inmediatamente antes de usarlo, y en caso necesario, almacenarlo en la oscuridad y durante el menor tiempo posible.

Bibliografía:

Methods for the Examination of Water and Waste Waters. 10th Ed. APHA, Inc. New York, 1960. Recommended Methods for the Microbiological Examinations of Foods. APHA, Inc. New York, 1958.

Agar Biotriptasa

Aislamiento de Brucella.

Cal. 140-1 450 9

Es un medio muy empleado en bacteriología sanitaria, y en el cual desarrollan adecuadamente los géneros *Brucella* y *Listeria*.

El medio se prepara de acuerdo a la fórmula del APHA.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------|----|
| Peplona especial No 2 | 20 |
| Dextrosa 1 | |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Agar 15 | |

pH final 7.2 i 0.2

Preparación:

Suspender 41 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Remojar de 10 a 15 minutos. Si el medio se va a emplear para aislar *Brucella* de la leche o de otros especímenes se añaden 1.4 ml de solución acuosa de cristal violeta al 0.1 %

Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Usos:

Se usa para el aislamiento y desarrollo de *Brucella* y en algunos procedimientos estándar de la APHA para el examen de productos lácteos. Cuando se sospecha la presencia de *Brucella* en algún material de flora mixta se puede añadir al medio cristal violeta al 0.1 %. Las colonias aisladas de este medio deben transferirse al medio de CTA o Agar de Soya Trypticaseína donde es posible conservarlas adecuadamente.

Para diferenciar las 3 principales especies de Brucellas, se deberán preparar por separado y a partir del Agar Biotriptasa, placas

con Fucsina básica al 1: 25,000 y tionina 1: 30,000. Incubar ambos medios a 35°C durante 5 días: *Brucella abortus* crece en Biotriptasa con fucsina pero no con tionina y requiere CO₂, *B. suis* no desarrolla frente a fucsina pero sí en tionina y tampoco requiere CO₂

Bibliografía:

Weed A.J. Clin. Path. 27:482, 1957.
APHA' Diagnostic Procedures and Reagents 3a. Edition, 1951.

Agar Brucella

Cal. 271-1

450 9

Para cultivar Brucellas de diversos productos clínicos, alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Es un medio de cultivo rico en nutrientes y factores accesorios de crecimiento, muy adecuado para aislar y desarrollar microorganismos exigentes. Se usa extensamente para aislar bacterias del género *Brucella* a partir de materiales contaminados con otros tipos de gérmenes, y para la producción de toxinas clostridianas.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|------|
| Peptona de Carne Peptona | 10.0 |
| de Caseína Dextrosa | 10.0 |
| Extracto de Levadura | 1.0 |
| Cloruro de Sodio | 2.0 |
| Bisulfito de Sodio Agar | 5.0 |
| | 0.1 |
| | 15.0 |

pH final 7.0 i 0.2

Preparación:

Suspender 43 g del polvo en un litro de agua destilada de buena calidad. Mezclar bien y calentar agitando continuamente y hervir más o menos un minuto hasta que se disuelva el material. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ~C) durante 15 minutos. Vaciar en cajas de Petri. Una vez solidificado el medio invertir las placas para evitar que se les deposite un exceso de humedad.

Usos:

Se emplea con buen éxito para aislar Brucellas de diversos especímenes contaminados con una microflora, saprófita o comensal, tanto de muestras clínicas como de alimentos, así como medio básico en bacteriología anaeróbica, animal o humana.

Las muestras en estudio (leches, cremas, natas, carnes, vísceras) podrán sembrarse directamente en las placas de Agar Brucella, o bien, a partir de suspensiones y/o maceradas en solución salina

estéril de órganos, heces, raspados de mucosa vaginal, etc.

Una buena medida es practicar siembras por duplicado e incubar una placa en ambiente normal y la otra en una atmósfera enriquecida con CO₂.

El Agar Brucella Bioxon puede hacerse más selectivo y dar un mayor número de aislamientos positivos, si se le agrega a cada 1000 ml del medio esterilizado y enfriado entre 45 y 50°C, 1.4 mg de violeta de etilo y la siguiente mezcla antimicrobiana:

| | | |
|--|------|------------------|
| Sulfato de Polimixina B | 6000 | unidades |
| Bacitracina. Cicloheximida (actidiona) | | 100 mg 100 mg |

Si se desea restringir notablemente la difusión (swarming) de los Proteus, agregar de 2 a 3 gramos de agar bacteriológico (Bioxon 150-1), por cada litro de medio.

Nota:

Si al medio de Agar Brucella se le agregan 5% de sangre desfibrinada estéril de borrego, más 5 mcg/ml de hemina y 10 mcg/ml de menadiona (vitamina K1), se prepara una excelente base enriquecida no selectiva, de uso general, para cultivar gérmenes anaerobias, incubando naturalmente en anaerobiosis. Es más, esta base enriquecida de Agar Brucella sangre puede transformarse en un medio selectivo adicionándole los antibióticos apropiados o algunos otros inhibidores tales como 20 mi de bilis (2.0 g en polvo) por litro de medio (Bioxon 182-2).

Bibliografía:

Kzudas y Mor-e, J. Bact 66:502, 1953.
Renoux G. Ann. Inst. Pasteur, 87:325, 1954.
Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 10th. Ed. APHA, Inc. New York, 1960.
Ed. London. Boston 1977.
Smith Louis Os. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Charles C. Thomas Pub. Springfield, Illinois, 1975.
Koneman, Allen, Dowell y Sommers. Color Atlas and Text. book 01 Diagnostic Microbiology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia 1979.

Agar Citrato de Simmons

Prueba de utilización de citrato de entero bacterias.

Cal. 216.1 450 9

El Agar Citrato de Simmons se usa para diferenciar las bacterias entéricas Gramnegativas, basándose en la utilización del citrato. Recomendable para la diferenciación de coliformes aislados del agua.

Fórmula en gramos por litro:

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Fostato (Fosfato) de Calcio - Amorlio | 1.00 |
| Fostato Dipotasico | 1.00 |
| Cloruro de Sodio | 5.00 |
| Citrato de Sodio | 2.00 |
| Sulfato de Magnesio | 0.20 |
| Agar | 15.00 |
| Azul de Bromotimol | 0.08 |

pH final 6.9 ± 0.2

Preparación:

Suspender 24.2 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.0 a 1.5 cm. Se puede emplear también como medio en placas.

Usos:

Este medio se puede emplear de la misma manera que el citrato de Koser para hacer la prueba de utilización de citrato como una de las reacciones del IMViC. Pueden hacerse cultivos en placa, o si se prefiere el medio inclinado, se inocula estriando la superficie y puncionando el fondo. Los cultivos se incuban durante 4 días de 35 a 37°C. Si no se obtienen resultados precisos, lo cual puede suceder con cepas de *Providencia*, es necesario hacer nuevas pruebas incubando a temperatura ambiente durante 7 días. Solamente los microorganismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono, crecen en el Agar Citrato de Simmons.

La aparición de un crecimiento visible generalmente va acompañado de un cambio alcalina (azul) del indicador.

Este medio puede ser utilizado especialmente en la diferenciación de bacilos entéricos como se indica a continuación:

| | | |
|-----------------|-------------|------------------------|
| Negativos | | Positivos Enterobacter |
| Escherichia | Arizona | Klebsiella |
| Shigella Mima | Citrobacter | Serratia |
| (- 0+) Listeria | Salmonella | |
| | Herella | |

Bibliografía:

Simmons J. Int. Dis. 39:209, 1926.
Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 11 Th Edition. APHA Inc. New York, 1960. Edwards & Ewing. Enterobacteriaceae.
USPHS. Publications 743. Washington. 1972. Torrp.grosa and Ortiz. Pediatrics 59:35, 1961.

Manual de Laboratorio de Bacteriología

Agar para Clamidosporas

Cal. 273-1 450 9

Medio especial que promueve y favorece la formación de Clamidosporas por *Candida albicans*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------------|----------|
| Agar | 15.00 |
| Sulfato de Amorlio. Fosfato | 1.00 |
| Monopotasico Azul de Tripan | 1.00 |
| Polisacáridos purificados | 0.10 |
| Blotina | 20.0 |
| | 5.0 mcg. |

pH final 5.1 ± 0.2

Preparación:

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua destilada de buena calidad. Dejar remojar el medio deshidratado (agitándolo de cuando en cuando), un lapso de 10 minutos para que se hidraten bien las partículas de Agar. Calentar con agitación continua y hervir un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos. Vaciar en cajas de Petri (12 ml por caja de 9-1 O cm de diámetro).

Si se desea preparar este medio aún más selectivo: Dejarlo enfriar entre 45 - 50°C Y agréguele 40 unidades de Penicilina. 40 microgramos de Estreptomina y de 0.1 a 0.5 mg de Cicloheximida por ml de medio de Agar para Clamidosporas. Hay que tener en cuenta que un cierto número de especies de *Candida* son inhibidas por 0.5 mg de Cicloheximida. Sin embargo, la mayor parte de las cepas de *Candida Albicans* son resistentes a 5 mg/ml de dicha droga. Pueden utilizarse otras mezclas antimicrobianas como Polimixina B 6000 unidades + Bacitracina 1 00 mg + 100 mg de Cicloheximida en un litro de medio de cultivo; o bien, 50 mg de Cloranfenicol en 1000 ml de medio.

La adición de antibióticos al medio de cultivo permite aislar directamente la *Candida albicans* a partir de la muestra clínica en estudio e identificar la formación de Clamidosporas; simultáneamente incubar por duplicado. a 28 y 35°C de 24 a 76 horas.

Obtención de Clamidosporas por *Candida albicans*.

Una tensión ligeramente baja de oxígeno favorece la formación de Clamidosporas por lo que la resiembra deberá hacerse por incisión profunda. Véase en este mismo manual, Agar de Czapek Dox (Bioxon 251-1). Las Clamidosporas son formas de resistencia, globulosas, redondas u ovals que presentan una pared doble y gruesa, siendo de ma

por tamaño que las blastosporas. Retienen el colorante azul de tripán. Se presentan tanto en la punta del filamento (terminales) o intercaladas dentro de la hifa (Clamidosporas intercalares).

Bibliografía:
Nickerson y Mankowsky J. Inl. Dis., 92:20. 1953.

Agar Cled

(Cisti na-Lactosa-Deficiente en electrolitos)

Cal. 232.1 450 g

Para cultivar gérmenes Gram positivos y Gram negativos en infecciones urinarias.

Para el desarrollo y el recuento en bacteriología urinaria de gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Impide el swarming ael Proteus.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|---------------------|------|
| Peptona de Caseina | -0 |
| Extracto de Carne | 10 |
| Peptona de Gelatina | 4~ |
| Lactosa | IQO |
| L.Cistina | Q128 |
| Azul de Bromotimol | Q~ |
| Agar | 1~0 |

pH linal 7.3 I. 0.2

Preparación.

Suspender 36.0 g en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar lentamente agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto y esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Vaciar en cajas de Petri. Una vez solidificado, invertir las placas para evitar el exceso de humedad.

Usos:

En el medio CLED (Cistina-Lactosa-deficiente en electrolitos) crecen profusamente la gran mayoría de las bacterias que provocan infecciones urinarias pudiéndose diferenciar o identificar sus colonias respectivas. Tiene además la ventaja de impedir la difusión del Proteus en la superficie del medio, lo que echaría a perder la prueba. La presencia de bacterias contaminantes como difteroides, lactobacilos y otros microbios, nos indica con qué tanto cuidado fue tomada la muestra de orina en estudio.

Los cultivos urinarios deberán realizarse con la primera muestra matutina y previo aseo escrupuloso de las zonas genitales. Utilícese el volumen medio de la misma para que la primera porción del chorro arrastre a los microorganismos estacionados normalmente en la uretra.

Los microorganismos que provocan infecciones en las vías urinarias son por lo general abundantes y de una sola especie. El col ibacilo es el germen que se aísla con mayor frecuencia.

La siembra de la muestra puede hacerse por el método de las diluciones o por estría sobre la superficie del agar con asa calibrada. Efectuar los recuentos de colonias después de 18 horas de incubación a 35°C. Reportar el número de ellas como colonias o bacterias por mi de orina. Recordar que un número de 100,000 (10)5 o más ya tiene un gran significado clínico para considerarse como una infección en vías urinarias.

Bibliografía:

Bebis T.D.J. Med. Lab. Technol. 26:38-41,1968. Mackey. J.P. y Sandys. G.H., 1965 B.M.H. 1 1173. Mackey. J.P. y Sandys. G.H., 1966 B.M.J. 1 1173. Guttman, D y Nayler G.R.E. 1967 B.M.J. 2 343-345.

Agar de Czapek

Dox 450 g

Para cultivar hongos y promover la formación de Clamidosporas.

Ampliamente usado en Microbiología de suelos para cultivar hongos y bacterias del mismo, así como en la formación de Clamidosparas por *Candida albicans*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|-------|
| Sacarosa | 30.0 |
| Nitrato de Sodio Fosfato | 3.0 |
| Dipotásico Sulfato de | 1.0 |
| Magnesio Cloruro de | 0.50 |
| Potasio Sulfato Ferroso | 0.50 |
| Agar | 0.01 |
| | 15.00 |

pH final 7.3 I. 0.2

"reparación:

Suspender 50 g del polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir hasta disolución completa del material (aproximadamente un minuto). Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Mezcle muy bien antes de vaciarlo en tubos o en cajas de Petri, (12 mi por caja). Deje que los tubos solidifiquen en posición inclinada. Si se requiere bajar el pH a 3.5, agregue 10 mi de ácido láctico al 10% por litro de medio después de la esterilización. El Agar de Czapek Dox es un medio semisintético que contiene nitrato de sodio como la única fuente de nitrógeno y es uno de los medios sólidos más útiles para el cultivo de hongos en general, especialmente saprófitos y fitopatógenos.

Técnica general para el cultivo de hongos:

Evitar la humedad excesiva del medio. Para ello vaciar el agar fundido enfriado entre 45 - 50°C, un volumen de más o menos 12 mi por caja de Petri desechable de 9 cm de

| MICROORGANISMOS | CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Grandes, amarillas elevadas, opacas, con el centro ligeramente más oscuro. Agar amarillo |
| Enterobacter | Semejantes a <i>E. coli</i> pero mucosas y de mayor tamaño. Agar amarillo. |
| Klebsiellas | Grandes amarillas o blanco amarillentas. Sumamente mucosas y elevadas. Pueden presentar una ligera tonalidad azulada. Agar amarillo. |
| Proteus | Azules, translúcidas con bordes irregulares. Poco elevadas. |
| Pseudomonas | Verde azuladas pálidas. Con superficie mate típica y contornos irregulares. Olor "dulzón". Agar azul verdoso. |
| Salmonella, Shigella, Serratia, Providencia. | Desde azules hasta azul intenso. |
| <i>Streptococcus fecalis.</i> | Muy pequeñas, de 0.4 mm. amarillas, opacas. Agar amarillo. |
| Estafilococos | Pequeñas de color amarillo intenso, opacas. Agar amarillo. |
| Corinebacterias | Muy pequeñas, grises. |

productora de pigmentos (amarillas o débilmente anaranjadas), que estén rodeadas por una zona clara, probablemente serán de estafilococos patógenos causantes de intoxicaciones por alimentos contaminados. Se recomienda repicar dichas colonias y emulsionarlas en 0.1 a 0.2 ml de Caldo Infusión de Cerebro Corazón (Bioxon 112) y efectuar pruebas de coagulasa. Así mismo, es conveniente agregar una gota de solución de púrpura de bromocresol al sitio de donde se tomaron las colonias para determinar si hubo fermentación del manitol. Un color amarillo indica reacción positiva. Las zonas o halos claros que se observan alrededor de la colonia indican degradación (proteólisis de la gelatina) por la enzima gelatinasa.

Suspender 43 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Una vez esterilizado enfriar a 40 - 45°C, Y vaciar en cajas de Petri estériles.

Usos:

Se puede emplear en análisis microbiológicos de productos congelados, para lo cual es necesario acidificar el medio con 7.1 ml de solución de ácido tartárico al 10% por cada litro de medio, después de que éste ha sido esterilizado, fundido y enfriado a unos 45°C.

Nunca se vuelva a utilizar después de acidificar el medio ya que el agar sufre una hidrólisis que lo vuelve incoagulable. Es un medio de uso general pero no es apto para reacciones de hemólisis por su alto contenido en dextrosa.

Bibliografía:
Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods APHA, Inc. New York, 1958.

Agar de Eosina y Azul de Metileno

Para el aislamiento y diferenciación de coliformes de otras enterobacterias de interés médico y sanitario.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------|--------|
| Peptona de Gelatina | 10.000 |
| Lactosa | 5.000 |
| Sacarosa | 5.000 |
| Fosfato Dipotásico | 2.000 |
| Eosina Y | 0.065 |
| Azul de Metileno Agar | 13.5 |

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación:

Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada de buena calidad. Mezclar y remojar unos 10 minutos para que se hidrate correctamente el Agar. Calentar agitando con frecuencia. Hervir un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Dejar que se enfríe la solución a unos 50°C. Agitar suavemente, evitando la formación de burbujas, para que la composición del medio se uniformice y vaciar en cajas de Petri estériles. Dejar que el medio se solidifique y luego invertir las placas para que no se deposite demasiada humedad sobre la superficie del mismo.
USOS:

Este es el medio clásico, que al igual que el Agar con Eosina y Azul de Metileno de Levine (Bioxon 223), se utiliza para el estudio de las enterobacterias. La morfología, aspecto y color de las colonias es la misma en ambos medios.

Agar de Chapman Stone

Cal. 297.1 450 g

Para aislar y diferenciar Estafilococos patógenos de la leche, productos lácteos y de otros alimentos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|------|
| Extracto de Levadura | 2.0 |
| Peptona de Caseína | 10.0 |
| Gelatina | 30.0 |
| D.Manitol | 10.0 |
| Sulfato de Amonio | 75.0 |
| Cloruro de Sodio Fosfato | 55.0 |
| Dipotásico Agar | 5.0 |
| | 15.0 |

pH final 7.0 ± 0.2

Preparación:

Suspender 202 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar correctamente. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir más o menos un minuto hasta disolución del medio. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 10 minutos. Vaciar en cajas de Petri aproximadamente 25 ml por placa.

Usos:

El Agar de Chapman Stone se usa igual que el Agar para Estafilococos No. 110 (Bioxon 105), distinguiéndose de éste en que ya contiene sulfato de amonio, por lo que se puede apreciar directamente la actividad de la gelatinasa (reacción de Stone). El medio tiene un color blanco y aspecto opaco. Las muestras sospechosas de contener estafilococos patógenos (alimentos diversos, especímenes clínicos), se siembran masivamente

Las colonias de Estafilococos típicamente productoras de intoxicaciones alimentarias (por ingestión de la enterotoxina) son amarillas, amarillo-doradas o de color naranja; fermentan el manitol, son coagulasa positivas, producen beta hemólisis en medios como Base de Agar Sangre (Bioxon 201) Y son gelatinasa positiva (reacción de Stone positiva).

Las colonias pálidas, prácticamente desprovistas de color, no productoras de pigmentos, a pesar de que estén rodeadas por zonas claras no deberán de tomarse en cuenta.

Bibliografía:
Chapman J. Bacl. 1945. 50: 201.
Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods A.P.H.A Inc. New York, 1958.
Standard Methods for Examination of Dairy Products. la. Ed., A.P.H.A Inc. New York, 1960.

Agar de Dextrosa

Recuento y aislamiento de bacterias.

Cal. 125.1 450 g

Es un medio de cultivo rico, que se recomienda para el recuento de microorganismos presentes en los concentrados de jugos de frutas. Al agregársele sangre se mejoran las características nutritivas, pudiendo aislarse varios gérmenes como Neisserias patógenas, Neumococos y otros.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------|----|
| Extracto de Carne | 3 |
| Mezcla de Proteínas | 10 |
| Dextrosa | 10 |
| Cloruro de Sodio Agar | 5 |
| | 15 |

pH final 6.9 ± 0.2

Además de emplearse ampliamente en Bacteriología Médica, se utiliza en las técnicas recomendadas por la American Public Health Association y la Sociedad Americana de Bacteriólogos, para la detección y recuento de microorganismos coliformes, que pueden estar contaminando diversos alimentos y aguas de bebida de diversa índole, destinadas al consumo humano.

Por su contenido en lactosa y sacarosa es posible diferenciar en el primocultivo: Salmonellas y Shigellas, Lactosa y Sacarosa negativas de otras enterobacterias lactosa negativas pero sacarosa positivas, tales como *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* y *Aeromonas*.

La microflora acompañante, que entorpece el aislamiento de los gérmenes de interés médico, es ampliamente inhibida por los colorantes de la fórmula, sobre todo la flora Gram positiva.

En este medio también es posible la identificación rápida de *Candida albicans* (incubado en CO₂) y a veces se logra aislar a Nocardia.

Bibliografía:
 American Public Health Association. Oidagnostic Procedures and Reagents. 2nd Ed. APHA Inc. New York. 1950. American Public Health Association. Examination of Dairy Products. 10th Ed. APHA, Inc. New York. 1953.
 Society of American Bacteriologists. Manual of Microbiological Methods McGraw.Hill New York. 1957.

Medio selectivo para aislamiento de estafilococos.

Cal. 105' 450 g

Es un medio altamente selectivo para el aislamiento e investigación de estafilococos. El medio contiene gelatina y manitol facilitando así el aislamiento de estafilococos que atacan y degradan dichas sustancias.

Fórmula aproximada en gramos por litros:

| | |
|-----------------------------|------|
| Extracto de Levadura | 2.5 |
| Peptona de Caseína Gelatina | 10.0 |
| Lactosa | 30.0 |
| O.Manitol | 2.0 |
| Cloruro de Sodio | 10.0 |
| Fosfato dipotásico Agar | 75.0 |
| | 5.0 |
| | 15.0 |

pH final 7.0.t. 0.2

Preparación:

Suspender 149 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar entre 10 y 15 minutos. Homogenizar y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

Una vez esterilizado homogenizar para suspender el precipitado y vaciar en cajas de Petri.

Usos:

El Agar para Estafilococos No. 110 se emplea para aislar estafilococos de procesos purulentos, casos de neumonía, meningitis, forunculosis, uretritis, vaginitis, etc. También se emplea este medio para aislar estafilococos que contaminan alimentos diversos y que producen intoxicaciones alimentarias.

Es posible enriquecer el medio agregando 5% de sangre con lo que se obtienen buenas reacciones de hemólisis y formación de pigmento amarillo dorado. Si se agrega a las colonias seleccionadas unas gotas de azul de bromotimol, podemos apreciar la fermentación del manitol apareciendo alrededor de ellas un halo amarillo. Por último, las placas se pueden cubrir con 5 ml de una solución saturada de sulfato de amonio, o mejor aún, con una gota de solución de ácido Sulfosalicílico al 20 %, e incubarlas durante 12 minutos para apreciar la hidrólisis de la gelatina: Se observan zonas claras (Reacción de Stone).

Bibliografía:
 Chapman J. Bacl. 51:409. 1946.
 Chapman J. Bacl. 63:147. 1952.

| M ICROORGAN ISMOS | CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS |
|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> | Elevadas o ligeramente convexas. De 2 a 3 mm. de diámetro. Presentan a la luz transmitida un centro azul-negro, rodeado de un borde angosto y claro; y brillo metálico azul verdoso, a la luz reflejada. Algunas cepas no muestran brillo metálico. Poca tendencia al desarrollo confluyente. |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> Klebsiella | COLÜ;ijas grandes de 4 a 6 mm. de diámetro, elevadas y mucoides con tendencia a unirse. Usualmente no presentan brillo metálico. A la luz transmitida muestran un centro grisáceo café y bordes claros. |
| Salmonella y Shigella | Ligeramente elevadas, de tamaño medio, de 1 a 2 mm. de diámetro. Transparentes, desde incoloras hasta amarinas. |
| <i>Candida albicans</i> | Después de 24 a 48 horas de incubación en atmósfera de un 10% de CO ₂ ya 35 - 36°C, pueden presentar colonias plumosas semejantes a telarañas (miceliales). Las colonias no siempre presentan un aspecto típico. |
| Estafilococos Coagulasa Positivos | Muy pequeños, puntiformes, incoloros y bastante inhibidos. |
| <i>Proteus Sp.</i> | Cuando no hay swarming, semejantes a Salmone-lla y Shigella. Puede evitarse la difusión del Proteus agregando al Medio de Cultivo huellas de alta-p-nitrofenil-glicerol. |

Agar para selección de Estreptococos

Agar Estreptosel

Ca!. 299.1 450 g

Medio para enriquecer y aislar selectivamente Estreptococos de diversos materiales clínicos y de productos de importancia sanitaria altamente contaminados.

Básicamente no es más que el Caldo para selección de Estreptococos o Caldo Estreptosel (Bioxon 264-1), al cual se le ha agregado 13.5 g de Agar.

Usos:

Tienen los mismos usos que el caldo anteriormente mencionado, pero si se le agrega 0.5% de sangre desfibrinada estéril de conejo o de cordero, aumenta notablemente su poder nutritivo (ya de por sí bastante considerable), sirviendo además como indicador de hemólisis. En estas condiciones da muy buenos resultados para aislar e identificar diferentes grupos de Estreptococos como a los alfa y beta hemolíticos, y naturalmente, a los no hemolíticos.

Preparación:

Suspender 44.10 g del polvo en un litro de agua destilada estéril de buena calidad. Mézclalos bien y déjelos remojando de 10 a 15

minutos para que se hidraten correctamente las partículas de Agar. Caliente a ebullición durante 1 minuto con agitación continua. Esterilice en autoclave a 12 libras de presión (118°C) durante 15 minutos. Evite el sobrecalentamiento. Vacíe en cajas de Petri. Déjelas solidificar y una vez endurecida SI inviértalas para evitar que se les deposite un exceso de agua de condensación.

Agar Eugon

Ca!. 254.1 4509

Medio excelente para obtener desarrollos abundantes de microorganismos muy exigentes y difíciles de cultivar.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------|------|
| Peplona de Caseína | 15.0 |
| Peptona de Soya | 5.0 |
| Cloruro de Sodio | 4.0 |
| Sulfito de Sodio | 0.2 |
| L.Cistina | 0.7 |
| Dextrosa | 5.5 |
| Agar | 15.0 |

pH final 7.0 ±: 0.2

Preparación:

Suspender 45.4 g de polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta disolución completa de los grumos de agar. Distribuir en tubos de ensayo o matraces y esterilizar a 12 libras (118°C) durante 15 minutos. Dejar que se enfríe el medio entre 45-50°C y agregar sangre desfibrinada estéril al 5% de cordero o de conejo, si se desea.

Usos:

Este medio permite obtener una buena multiplicación de microorganismos (crecimiento eugónico) aún con los gérmenes más difíciles de cultivar, tales como Haemophilus, Neisserias, Pasteurellas, Bruceltas, Lactobacilos, etc.

Es muy útil tanto en Bacteriología Médica como en Microbiología de Alimentos. Asimismo, este medio es ideal para cultivar microorganismos delicados productores de enfermedades y para obtener cultivos masivos en la preparación de antígenos y vacunas, y para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

En Bacteriología Alimentaria se usa ampliamente para detectar la presencia de bacilos lácticos en carnes crudas, ahumadas, embutidos, etc., así como en el análisis bacteriológico de la leche y otros productos lácteos. Para el recuento de colonias en alimentos enlatados, y en general, en la detección y estudio de problemas sanitarios que se presentan en la industria alimentaria.

La adición de sangre desfibrinada (puede hacerse aún más rico adicionándole 1.0 ml de polienriquecimiento por cada 100 ml del medio) achocolatada o no, permite el desarrollo de *Histoplasma capsulatum* y Nocardia. También se emplea para el análisis de materiales clínicos como sangre, LCR o líquido pleural. Estas muestras, en caso de infección contienen un solo germen y generalmente no están contaminadas con flora acompañante alguna.

Bibliografía:

Vera M.J. Bac!. 54:14. 1947.
Peczar y Vera Milk Plant Monthly, 38:30, 1949. Frank J. Bac!. 70:269, 1955.

Agar Extracto, Glucosa y Trypticaseína

Recuento en placas de bacterias en aguas potables y de drenaje.

Ca!. 133.1 450 g

Es un medio altamente nutritivo, y está preparado de acuerdo con la fórmula del agar estándar nutritivo (APHA).

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------|------|
| Peplona de Caseína | 5.0 |
| Extracto de Carne | 3.0 |
| Dextrosa 1.0 Agar | 15.0 |

pH final 7.0 ±: 0.2

Preparación:

Suspender 24 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Una vez esterilizado enfriar a unos 40-45°C y vaciar en cajas de Petri.

Usos:

El Agar Extracto, Glucosa y Trypticaseína se emplea para el recuento bacteriano en aguas potables y de drenaje por el método de la cuenta en placas.

Las técnicas que se siguen para preparar diluciones, distribuir en placas, incubar, contar colonias, etc., se ajustan a las indicaciones del libro Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters.

Bibliografía:

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 11th Edition APHA, Inc. New York. 1960.

Agar de MacConkey

Medio empleado ampliamente para aislar e identificar selectivamente a enterobacterias como Salmonellas, Shigellas y coliformes a partir de heces fecales, orinas, aguas negras y diversos alimentos

Usos:

El espécimen puede sembrarse directamente en la placa por estría superficial, o bien inocularlo en medios líquidos de enriquecimiento, tales como Caldo Tetracionato, Caldo Selenito Cistina o Caldo GN. Incubar placas y caldos a 35°C de 18 a 24 horas. Hacer resiembras de estas últimas en placas de Agar de MacConkey y volver a incubar.

Se recomienda sembrar simultáneamente las muestras en otros medios más selectivos tales como Eosina y Azul de Metileno, Agar SS, Agar Tergitol 7, Agar XLD, Agar Entérico Hektoen, Agar Sulfito de Bismuto (altamente específico para *Salmonella typhi*), Agar Verde Brillante, especial para Salmonellas. Véase en este mismo manual las indicaciones y usos de esos medios.

Los gérmenes Gram positivos son inhibidos por las sales biliares y el cristal violeta. Las enterobacterias fermentadoras de la lactosa bajan el pH del medio que es detectado por el indicador rojo neutro dando colonias rojas o rosadas. Las no fermentadoras de la lactosa dan colonias transparentes, incoloras o ambarinas.

En el agar de MacConkey crecen también bacilos Gram negativos que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, como Pseudomonas y Aeromonas. Asimismo, pueden desarrollarse en número reducido colonias puntiformes de *Streptococcus fecalis* (enterococos) de color rojo y de algunos estafilococos cuyas colonias son pequeñas, opacas de color rosa pálido.

Por último, este medio puede usarse en la diferenciación de especies de Mycobacterium.

Cal. 109.1

450 9

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|-------|
| Peptona de Gelatina | 17.0 |
| Mezcla de Peptonas | 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 :L 0.2

Preparación:

Suspender 50 gramos del medio en un litro de agua destilada o desionizada de buena calidad. Remojar bien entre 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb) durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y vaciar en cajas de Petri unos 20 ml por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite exceso de humedad en la superficie del medio.

| CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS | GERMENES |
|--|-------------------------|
| De rojas o rosadas. No son mucoides. Pueden rodearse de un precipitado opaco de sales biliares. | <i>Escherichia coli</i> |
| Grandes, rosadas, mucoides. | Klebsiella |
| Grandes, rosadas, No son mucoides. | Enterobacter |
| Rojas o rosa. No son mucoides. | Serratia |
| Incoloras, transparentes. Rojas si fermenta a la lactosa. | Arizona |
| Incoloras, transparentes, rojas si fermentan la lactosa. | Citrobacter |
| Incoloras y transparentes | Proteus |
| Incoloras, hasta café verdosas. Olor dljlzaino característico. | Pseudomonas |
| Incoloras, transparentes o ambarinas. | Salmonella |
| Incoloras, transparentes o rosa muy tenue. | Shigella |
| Puntiformes, rosa pálido, opacas y escasas. | Estafilococos |
| Escasas, puntiformes, rojas, opacas y con un halo claro como de 1 mm de diámetro alrededor de la colonia. | Enterococos |
| <p><i>Bibliografía:</i> MacConkey J. <i>Hig.</i> 5:33, 1905. Joseph Md. <i>Sta/e. Dep/- Heal/. Procedures.</i> 1960.</p> | |

Para bajar el pH del medio a 4.0 se agregarán 15 ml de solución de ácido láctico al 10%, por cada litro del mismo. Una vez acidificado éste, no se vuelva a calentar porque el agar sufre un proceso de hidrólisis y pierde su capacidad gelificadora.

Bibliografía:
Huppert y Walker, A.J. Clin. Path 29:291, 1958. Neurath y Berliner Science, 146:648, 1956.
Bridges, Olivo y Chandler, Applied, Microbiol, 4:147,1956.

Después de este tiempo se tendrán que revisar periódicamente las zonas de inhibición ya que el microorganismo puede desarrollar cuando la concentración del agente antimicrobiano comienza a disminuir.

Se obtienen mejores resultados para aislar Neisserias patógenas preparando un agar chocolate con el Mueller Hinton adicionándole a cada 100 ml del medio terminado y flúido 1.0 ml de la suspensión VCN (Bioxon 303), más 1.0 ml del poli enriquecimiento (Bioxon 304).

Bibliografía:
Harris and Coleman Diagnoslic, Proeedures and Reagents, 4th Edition APHA, Inc. New York, 1963.
Mueller and Hinton A. protein-free medium for primary ;atation 01 the Gonocoeus and meningocoeus. Proe. Soc. Exp. Biol. and Med. 49:330, 1941.

Agar Micológico

(Agar Micofil)

Cal. 247-
I 450 9

Para el cultivo, recuento, conservación, identificación y producción de pigmentos por diversos hongos presentes en bebidas, alimentos, materiales clínicos y productos farmacéuticos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------|------|
| Peptona de Soya | |
| Dextrosa | 10.0 |
| Agar | 10.0 |
| | 16.0 |

pH final 7.0 :!:. 0.2

Preparación:

Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos y mezclar bien. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 12 libras de presión (118°C) durante 15 minutos.

En Microbiología Médica se le utiliza para aislar hongos patógenos causantes tanto de micosis superficiales como de micosis profundas. Al mismo tiempo, se aconseja hacer cultivos simultáneos con medios que contienen antibióticos como el Agar para Selección de Hongos (Bioxon 259). De cualquier modo, al Agar Micológico se le pueden agregar 0.5 g de cicloheximida por litro de medio para evitar el desarrollo de hongos saprófitos (mohos) y 0.05 g de cloranfenicol, que impide el crecimiento de las bacterias contaminantes.

El Agar Micológico se usa también para valorar la actividad fungicida de medicamentos farmacéuticos. También para efectuar recuentos de levaduras, mohos y bacterias (recuento total de microorganismos) en diversos preparados de la industria farmacéutica, Para obtener solamente el número de levaduras y mohos, deberá bajarse el pH del medio de 4.0 a 4.7. Lo anterior también es válido para la industria de bebidas y alimentos.

Agar de Mueller Hinton

Pruebas de sensibilidad a antibióticos y cultivo de Neisseria

Cal. 110,1 450 9

En un medio muy rico en nutrientes que se recomienda para el aislamiento y desarrollo de gonococos y meningococos. También se emplea, sobre todo, en las pruebas de sensibilidad (antibiogramas).

Fórmula aproximada en gramos p" litro:

| | |
|---|-------|
| Infusión de Carne de Res | 300.0 |
| Peptona de Caseína Acida ¹ , Almidón | 17.5 |
| Agar | 1.5 |
| | 17.0 |

pH final 7.4 :!:. 0.2

Preparación:

Suspender 38 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto, y esterilizar a 121°C (15 lb de presión) por un tiempo no mayor de 15 minutos.

Enfriar a 40-45°C y vaciar en cajas de Petri. Si se desea, pueden prepararse placas o tubos de agar "chocolate", previa adición de sangre de carnero o humana, preferiblemente la primera, calentando en baño maría a 80° C 10 minutos. No sobrecalentar el medio en ningún momento.

Usos:

Es un medio útil para el desarrollo de bacterias del género Neisseria. Se recomienda incubar las cajas a 35°C, en atmósfera de CO₂ (técnica de la vela). El medio deberá mantenerse húmedo en su superficie; esto puede lograrse si dentro de la jarra, envases de hojalata, frasco de vidrio de boca ancha, etc., se coloca una esponja o algodón húmedo y una vela encendida, cerrando luego herméticamente.

Para realizar las pruebas de sensibilidad con sulfonamidas, las cajas deben examinarse después de 12 a 18 horas de incubación.

Agar Nutritivo

Uso general en bacteriología

Cat.104.1 450 9

El Agar Nutritivo es un medio de uso general en el laboratorio, no selectivo y adecuado para el cultivo de microorganismos poco exigentes. Puede emplearse en bacteriología sanitaria, médica e industrial.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|------------------------------|------|
| Peplona de Gelatina Extracto | 5.0 |
| de Carne de Res Agar | 3.0 |
| | 15.0 |

pH final 6.8 :!:. 0.2

Preparación:

Suspender 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 15 minutos, mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Usos:

Muy empleado en los análisis bacteriológicos de aguas potables, de uso industrial y residuales, leches y otros alimentos. Se le emplea también en la multiplicación de microorganismos para producir vacunas y antígenos en general; en las pruebas de sensibilidad y resistencia, y como base para preparar medios de cultivo más ricos adicionados de líquido ascítico, etc. Lo mismo que en pruebas bioquímicas, por ejemplo indol Descarboxilasa y lisina Descarboxilasa.

Bibliografía:
Wetmore and Goehenour J. Bael. 72:79, 1956. Greenberg and Cooper Can. Med. Assn. J. 83:143, 1960.

Agar Proteosa No. 3

Aislamiento de bacterias patógenas

Cal. 204.1 450 g

El Agar Proteosa No. 3 ha sido utilizado para el aislamiento y cultivo de gérmenes patógenos exigentes, especialmente *Neisseria gonorrhoeae*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|------------------------|------|
| Mezcla de Peptenas | 20.0 |
| Dextrosa | 0.5 |
| Cloruro de Sodio. | 5.0 |
| Fosfato de Sodio. Agar | 5.0 |
| | 15.0 |

pH final 7.3 IO.2

Preparación:

Suspender 45 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar y añadir 5% de sangre de cordero desfibrada y estéril. Si el medio va a usarse para el cultivo de *Neisseria*, calentar la mezcla a 80°C, durante 10 minutos o hasta que adquiera un color café chocolate; enfriar y vaciar en cajas de Petri sin dejar de agitarla. Agregar antibióticos VCN (Bioxon 303) y polienriquecimiento (Bioxon 304), si se desea.

Usos:

El agar "chocolate" se utiliza en diversas formas. Para obtener un desarrollo satisfactorio de Gonococos, se pueden añadir materiales de enriquecimiento tales como plasma de caballo, hemoglobina y azul nilo o almidón y sangre.

Al incubar placas para el cultivo de *Neisseria* deberá usarse una atmósfera reforzada con bióxido de carbono, en un tarro con bujía o vela encendida. Incubar a 35°C pero no a más de 37°C.

Se obtienen mejores resultados para aislar *Neisserias* patógenas, agregando a cada 100 ml de agar chocolate, 1.0 ml de la mezcla antimicrobiana VCN Bioxon más 1.0 ml de solución de Polienriquecimiento Bioxon.

Bibliografía:

Pelzer and Steffen J. Ven. Dis. Int. 23:224, 1942. Steinberg and Molloy J. Bacl. Clin. Med. 27:56, 1942.

Agar de Sal y Manitol

Aislamiento de estafilococos

Cal. 146.1 450 g

Es un medio selectivo muy empleado para aislar estafilococos patógenos de materiales clínicos diversos (orina, genitales, heridas, exudados faríngeos, etc.). También se utiliza en la industria alimenticia con los mismos fines, el aislamiento e identificación de Estafilococos que se encuentran en la leche y productos lácteos, carnes y derivados cárnicos incluyendo conservas de pescado.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------|-------|
| Extracto de Carne | 1.0 |
| Mezcla de Peptonas | 10.0 |
| Cloruro de Sodio | 75.0 |
| D.Manitol | 10.0 |
| Agar | 15.0 |
| Rojo de Fenol. | 0.025 |

pH final 7.4 IO.2

Preparación:

Suspender 111 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y remojar unos 15 minutos. Mezclar bien y calentar a ebullición durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Vaciar en cajas de Petri.

Usos:

La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio, de rosado a amarillo. Debido a su alto contenido de cloruro de sOodio, puede hacerse una siembra masiva del material en estudio. Generalmente se incuban las placas unas 36 hrs., apareciendo las colonias de estafilococos no patógenos de tamaño pequeño y rodeadas de una zona roja; en cambio, las colonias de estafilococos patógenos fermentadores del manitol, dan colonias más grandes y rodeadas de una zona amarilla. Si agregamos a cada litro del medio, una yema de huevo en condiciones de esterilidad, los estafilococos, que además de fermentar el manitol producen lipasa, darán un precipitado amarillento de ácidos grasos alrededor de la colonia. Este fenómeno concuerda bastante bien con la propiedad de coagular el plasma que presentan los estafilococos patógenos coagulasa positivos.

Bibliografía:

Me. Cutloch Am. J. Vel. Research 8:173. 1947. Velilla. Faber and Pelczar Am. J. Vel. Research 8:275. 1947

Manual de Laboratorio de Bacteriología

Agar para Salmonella y Shigella (Agar SS)

Aislamiento de enterobacterias patógenas

Cal. 144.1 450 g

Medio diferencial selectivo muy empleado en bacteriología sanitaria para aislar *Salmonella* y *Shigella*, a partir de heces, orina y alimentos diversos, tanto frescos como enlatados. La inhibición de bacterias Gram positivas se obtiene por una mezcla de sales biliares.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|----------------------------|----------|
| Extracto de Carne | 5.0 |
| Mezcla de Peptonas Lactosa | 5.0 |
| Mezcla de Sales Biliares | 10.0 |
| Citrato de Sodio | 8.5 |
| Tiosulfato de Sodio | 8.5 |
| Citrato Férrico | 8.5 |
| Agar | 1.0 |
| Rojo Neutro | 13.5 |
| Verde Brillante | 0.025 |
| | 0.330 mg |

pH final 7.0 IO.2

Preparación:

Suspender 60 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 15 minutos. Agitar para obtener una suspensión homogénea, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto. No deberá esterilizarse en autoclave. Verter en placas. Evítase la congelación.

Usos:

Debido a su gran poder de inhibición, este medio puede sembrarse con una buena cantidad del material en estudio, pero además deberán inocularse paralelamente otros medios menos inhibidores como Agar de Desoxicolato, Agar de MacConkey, Agar de Eosina y Azul de Metileno, Agar Tergitol7, Agar XLD y Agar Entérico Hektoen.

Las bacterias no fermentado ras de la lactosa (supuestamente patógenas) dan colonias claras, transparentes e incoloras, en cambio los coliformes que son bastante inhibidos, forman colonias pequeñas que varían del rosa al rojo. Las bacterias formadoras de sulfuros dan colonias que presentan un centro negro y un halo claro alrededor cOmo *Proteus* y algunas especies de *Salmonella*.

Las placas del medio se conservan en buenas condiciones de trabajo durante una semana en el refrigerador.

| BACTERIAS | COLONIAS |
|---|---|
| Shigella y la mayor parte de las Salmonellas | Claras, incoloras, transparentes. |
| <i>Escherichia coli</i> | Pequeñas que van del rosa al rojo. |
| Enterobacter, Klebsiella | De mayor tamaño que las de <i>E. coli</i> . mucosas, opacas de crema pálido hasta rosa. |
| Proteus y algunas Salmonellas | Incoloras, transparentes; con un centro negro si producen H ₂ S. |
| Paper Read Al Microbiological Congress, 1950. | |

Bibliografía:

Pub. Health Reports. 65: 1075, 1950.

~~Proc. 22nd Ann. Meet. Northeastern Conf. Lab. Workers~~
in Pullorum Disease Control Burlington. Vermont. June
20-21, 1950.

Agar de Soya Trypticaseína

Aislamiento y cultivo de
gérmenes exigentes

Cal. 108.1 450 g

Es un medio sólido, muy rico en nutrientes por lo que tiene un "uso general" en los labo

ratorios de Microbiología. Permite la multiplicación abundante y satisfactoria de gérmenes de desarrollo difícil y exigentes, como Neumococos, Estreptococos, Neisserias, etc. Muy útil para pruebas de hemólisis y de sensibilidad a los antibióticos (antibiogramas).

Una lista somera de microorganismos que se desarrollan en este medio es la siguiente:

Estreptococos, Neumococos, Neisseria, Brucella, Corynebacterium, Listeria, Pasteurella, Vibrio, *Haemophilus vaginalis*, Candida, etc.

Bibliografía:

Altord, Wiese and Gunter J. Bacl., 69:516. 1955.
Ctapper and Parker J. Bacl. 70:125. 1955. Standard Methods for the Examination of Dairy Products 11th Ed. A.P.H.A" Inc. New York, 1960. Hentges A.J. Clin. Path. 38:304. 1962.
Hereluk and Gunderson. Appleid Microbiot. 22:299. 1959.

Fórmula aproximada de gramos por litro:

| | |
|-----------------------|----|
| Peptona de Caseína | 15 |
| Peptona de Soya | 5 |
| Cloruro de Sodio Agar | 5 |
| | 15 |

pH final 7.3 1:... 0.2

Preparación:

Suspender y remojar de 10 a 15 minutos 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto para que se disuelva. Esterilizar en autoclave entre 118 y 121°C ya una presión no mayor de 15 lb por 15 minutos. En caso de preparar volúmenes grandes, aumentar el tiempo de esterilización pero no la presión ni la temperatura. Enfriar y vaciar en placas de Petri. Si se preparan placas de agar sangre para estudios de hemólisis, agregar de 5 a 10% de sangre de conejo o de carnero, preferiblemente de esta última.

Usos:

Por contener dos P1ptonas obtenidas por hidrólisis enzimática a partir de caseína y soya, en este medio se desarrollan ampliamente una gran variedad de microorganismos, incluyendo aquellos de cultivo difícil y delicado, tanto aerobios como anaerobios. Como carece de carbohidratos es muy útil para estudiar reacciones de hemólisis y también para preparar agar-chocolate.

Si se desea puede agregársele antibióticos.

También se le pueden agregar otros nutrientes o bien inhibidores para usos especiales.

Agar Sulfito y Bismuto

Es un medio de Wilson y Blair* modificado y altamente selectivo para aislar *Salmonella typhi*, así como otros bacilos entéricos, de heces, aguas negras, aguas de bebidas y diversos alimentos

Cal. 212-1 450 9

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Mezcla de Peptonas | 10.000 |
| Extracto de Carne | 5.000 |
| Dextrosa | 5.000 |
| Fosfato Disódico | 4.000 |
| Sulfato Ferroso | 0.300 |
| Indicador de Sulfito de Bismuto | 8.000 |
| Verde Brillante | 0.025 |
| Agar | 20.000 |

pH final 7.5 ± 0.2

Preparación:

Suspender 52 g del polvo en un litro de agua destilada, aunque en general, los *autores ingleses* recomiendan no reconstituir más de 400 ml en un solo matraz para lograr una mejor uniformidad de mezclado. Mezclar muy bien y remojar el medio deshidratado de 10 a 15 minutos para obtener un buen gel. Hervir no más de un minuto agitando continuamente para que se disuelva completamente el Agar. Dejar que el medio se enfríe a 45°C

Esto es muy importante) y sin dejar de agitarlo, vacíe en cajas de Petri no menos de 20 ml del medio fluido. Las placas deben permanecer parcialmente descubiertas hasta que se seque la superficie del medio y usarlos el mismo día. Evite el sobrecalentamiento.

La selectividad del medio depende en gran parte de la *dispersión uniforme* del precipitado del sulfito de bismuto en el gel final. Es por esta razón que el medio debe mantenerse bien mezclado y no vaciarse mientras esté demasiado caliente. En el medio caliente una vez depositado en las placas, tiende a precipitarse el sulfito de bismuto en forma irregular y desordenada propiciando que en unas zonas se encuentre demasiado concentrado y en otras casi sin nada o ausente.

Las placas delgadas con poco medio, se desecan pronto y dan reacciones retardadas, inhibiendo el ennegrecimiento de las colonias productoras de sulfuros, debido a la concentración de los ingredientes.

* No confundirlo con el medio de Wilson y Blair para aislar *Clostridium perfringens*.

Usos:

Junto a este medio, por ser fuertemente inhibitor, se aconseja inocular también otros medios selectivos menos inhibidores, tales

Por lo común, el Agar Sulfito de Bismuto se siembra por estría superficial tratando de obtener colonias muy bien aisladas. Pueden hacerse inoculaciones por vaciado de una suspensión de heces como del 10% en agua destilada o en solución salina estériles. Vaciar aproximadamente 5 ml de la suspensión en no menos de 20 ml del medio previamente fundido y enfriado a unos 45-50°C. Mezclar perfectamente, dejar que solidifique (que se forme un gel) e incube de 24 a 48 hrs.

Las placas una vez solidificadas deberán presentar una opacidad crema uniforme, y gradualmente un color verde muy pálido. Si se guarda en refrigeración, el medio que está en forma reducida, se irá oxidando poco a poco hasta adquirir un color francamente verde. Al llegar a este momento descártelo. Cook (1952) recomienda dejarlo p.n refrigeración durante 4 días antes de usarlo para aislar *Salmonella typhimurium* con el fin de hacerlo menos inhibitor. En presencia de H₂S, las Salmonellas reducen las sales de hierro y bismuto a sulfuro de hierro negro que se deposita en la colonia, y, a bismuto metálico (Mac-Coy, 1962) que se precipita en el medio de cultivo, formando un halo brillante pero menos oscuro alrededor de la misma.

| CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS | |
|---------------------------------|--|
| <i>Salmonella typhi</i> | Elevadas con centro negro, bordes claros y translúcidos. Colonias en "ojo de pescado o de conejo" Se vuelven uniformemente negras a las 48 horas. Entre las 18 a 24 horas se forma en el medio de cultivo un halo negro grisáceo y con brillo metálico rodeando a la colonia. |
| Otras Salmonellas | Elevadas y generalmente más pequeñas que las de <i>S. typhi</i> . Negras si producen H ₂ S. Halo negro grisáceo con brillo metálico después de 36 a 48 horas de incubación. Verdosas si no son productoras de sulfuros como <i>S. paratyphi</i> A. Pequeñas y pardas como <i>S. choleraesuis</i> y <i>S. gallinarum</i> , que son bastante inhibidas. |
| Arizona y Citrobacter | Grandes elevadas, negras grisáceas, como gotas de plomo. Halo gris negro y con brillo metálico. Las cepas no fermentadoras de la lactosa varían del verde al café. |
| COllformes, Proteus | Desarrollo ocasional. Colonias que pueden ser verdes, cafés y aún negras. Estas últimas más pequeñas que <i>S. typhi</i> y por lo general sin brillo metálico en el medio que rodea a la colonia. |
| Shigella | Casi todas inhibidas. En el caso de crecer. <i>Sh. flexneri</i> y <i>Sh. sonnei</i> son de color café, deprimidas en el centro y con bordes elevados (crateriformes). |

Azul de Bromotimol 0.04
 Agar 14.0

sa y dan colonias amarillentas por la producción de ácido.

pH final 8.6 ± 0.2

Tanto el color negro de la colonia como el brillo metálico del halo aumentan si la placa se deja de 2 a 3 horas a temperatura ambiente y en presencia de la luz.

Preparación:

Suspender 86 g del polvo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante 1 minuto. Enfriar entre 45 - 50°C Y vaCiar en cajas de Petri. No esterilizar en autoclave.

Algunas cepas de *Proteus* fermentado res de la sacarosa pueden formar colonias amarillentas similares a las de los *Vibrios*.

Bibliografía:
 Cholera Information (W.H.O. 1965).
 WHO Expert Comitee on Cholera (2 and Rep. Techn., Rep. Series No. 352 1967). Felsemfeld, Bu" World Org. 34: 161, 1966. Kobayashi. T. Enomoto S. Sakasaki. R.Y. Kwajaras. S., Jap. J. Bact 18 387 291. 1963.

Las colonias de coliformes, *Shigella* (que generalmente no desarrollan) y *Proteus* presentan un color verde, café o negro y no ennegrecen el medio. Las placas deberán incubarse hasta 48 horas.

Usos:

Se emplea ampliamente para aislar y cultivar diversas especies del género *Vibrio* que pueden provocar cólera, diarreas coliformes e intoxicaciones por alimentos contaminados. Las 2 últimas afecciones provocadas sobre todo, a partir de diversos pescados y mariscos que se ingieren crudos o semicrudos y que pueden ser causadas por *Vibrio parahemolyticus*.

Agar Tech

Cal. 265-1 450 g

Incrementa y promueve la formación de piocianina por *Pseudomonas*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------------|------|
| Peptona de Gelatina. | 20.0 |
| Cloruro de Magnesio | 1.4 |
| Sulfato de Potasio. Agar | 10.0 |
| | 13.6 |

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación:

Suspender 45 g de polvo en un litro de agua destilada de buena calidad. Agregar 10 ml de glicerina y mezclar muy bien. Remojar durante unos 10 minutos para que se hidraten correctamente las partículas de Agar.

Agitando continuamente, calentar a ebullición, más o menos por un minuto. Distribuir en tubos de ensaye colocando la cantidad suficiente para que se forme un fondo de buen tamaño y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (118-121°C) durante 15 minutos. Los tubos de ensaye se dejarán solidificar en posición inclinada. Pueden prepararse placas de Agar, si así se requiere.

Usos:

El cultivo en estudio deberá sembrarse por estría superficial e incubarse a 35°C de 24 a 72 horas, o más si es necesario.

El Agar TECH promueve y favorece la producción de piocianina. El pigmento de color verde difunde el agar del medio de cultivo a partir de la colonia. A la observación bajo luz ultravioleta, la piocianina da una fluorescencia verdosa o azul verde.

Si la cepa de *Pseudomonas* forma también fluoresceína, la fluorescencia observada es de color azul verdoso. En cambio, si hay formación de piorrubina, la fluorescencia es de color rojizo.

El color y tonalidad del pigmento varían con la cepa de *Pseudomonas*. El pigmento puede extraerse con cloroformo.

Bibliografía:
 King Ward and Ramey J. Lab. and Cin. Med. 44:30. 1954.
 Burton. Eagle Campell Canad J. Res. C. 25:121, 1947 Sellers and Graber. Bacteriol Proc. M. 108: 129. 1961.

Agar

TCBS para cultivar *Vibrios* selectivamente

Cal. 268-1 450 g

Para el aislamiento selectivo de vibrios patógenos a partir de materiales clínicos, aguas y alimentos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-------------------------------|------|
| Extracto de Levadura. | 5.0 |
| Mezcla de Peplonas | 10.0 |
| Citrato de Sodio | 10.0 |
| Tiosulfato de Sodio.. | 10.0 |
| Bilis de buey. | 5.0 |
| Colato de Sodio | 3.0 |
| Sacarosa. | 20.0 |
| Cloruro de Sodio. | 10.0 |
| Citrato de Hierro. | 1.0 |
| Azul de Timol. | 0.04 |

El Agar TCBS, es altamente inhibitorio para las Enterobacteriaceas, incluyendo coliformes y *Proteus*. Los Enterococos son también inhibidos en gran parte, de tal manera que se favorece grandemente la proliferación de los *Vibrios*, como el antes mencionado, el *V. cholerae* y el *V. alginolyticus*.

El material sospechoso (heces, vómitos, heces rectales, pescados u otros alimentos), se siembra masivamente por estría superficial y se incuba a 35°C, de 18 a 24 horas.

Casi todos los *Vibrios* fermentan la sacarosa

| MICROORGANISMOS | CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS |
|---|---|
| <i>Vibrio cholerae</i> y su biotipo el Tor | Grandes, lisas, elevadas, amarillas o café claro-amarillentas. De 2 a 3 mm. de diámetro. Agar amarillo. |
| <i>V. parahemolyticus</i> (GRUPO 1) | Incoloras con el centro verde. De 3 a 4 mm. de diámetro. El Agar sin cambio. |
| <i>V. parahemolyticus</i> (GRUPO 11) | Amarillas o café claro-amarillentas. De 3 a 4 mm. de diámetro. Agar Amarillo. |
| <i>V. alginolyticus</i> | Amarillas, grandes. |
| Enterobacteriaceae | Escaso desarrollo, puntiformes, transparentes. Agar sin cambio. |
| <i>Pseudomonas</i> <i>Aeromonas</i> | Pequeñas azules. |
| <i>Enterococos</i> | Escaso desarrollo, puntiformes. Agar amarillo. |

Agar Tergitol 7

Detección de organismos coliformes

Cal. 118-1 450 9

Es un medio de cultivo selectivo muy útil para detectar bacterias coliformes en materiales clínicos como heces y orina. Se le ha empleado así mismo en análisis bacteriológico de aguas y alimentos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--|-------|
| Hepladecil Sullato de Sodio | .01 |
| Mezcla de Peptonas Extracto de Levadura. Lactosa | 5.0 |
| Agar | 3.0 |
| Agar de Bromotimol | 10.0 |
| | 15.0 |
| | 0.025 |

pH final 6.9 .:t. 0.2

Preparación:

Suspender 33 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada o desmineralizada y dejarlo remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Esperar a que se enfríe a unos 45 -50°C Y si se desea, agregar 3.0 ml de una solución de trifetil tetrazolio estéril al 1 %. Distribuir en placas de Petri.

Usos:

Este medio es muy adecuado para el desarrollo de microorganismos coliformes ya que da alrededor de un 30% de recuentos más altos que otros medios selectivos empleados para el mismo fin. *Escherichia coli* produce colonias de mayor tamaño, amarillo verdosas y mucosas. Los microorganismos que no fermentan la lactosa desarrollan colonias azules. El heptadecilsulfato de sodio (tergitol 7) inhibe la flora secundaria indeseable e impide la difusión del *Proteus* (swarming).

En ocasiones se agrega trifetil tetrazolio para el reconocimiento e identificación de *E. coli* y *E. aerogenes*.

| COLONIAS | MICROORGANISMOS |
|---------------------------------------|--|
| Sin TIC. | |
| Amarillas, con halo amarillo. | <i>Escherichia coli</i> . |
| Amarillo-verdosas, grandes, mucosas. | Enterobacter, Klebsiella |
| Azules | Gérmenes lactosa-negativos |
| Con TIC. | |
| Amarillo-verdosas, con halo amarillo. | <i>Escherichia coli</i> . Enterobacter |
| Rojizas, con halo azulado. | Hafnia, Serratia, Providencia, Proteus, Pseudomonas y Citrobacter. |
| Azuladas. | Lactosa-negativos, levaduras |
| Bibliografía: | |
| Chapman J. Bact. 53:504, 1947 | |
| Chapman J. Bact. 64:769. 1952. | |
| Chapman AJPH 41:1381.1951. | |
| Mossel J. Applied Bact. 25:20. 1962. | |

Usos:

Debido a que es un medio fuertemente inhibidor, inocule las placas con una asada bien cargada con el material en estudio. Al mismo tiempo siembre otros medios selectivos menos inhibidos como el Agar Desoxicolato, SS, XLD, MacConkey, EMB, Agar Tergitol 7, Agar Entérico Hektoen. Cuando se sospecha que el material en estudio contiene bajas concentraciones de *Salmonella* es necesario inocular la muestra inicialmente en Caldo Tetratiónato o Caldo Selenito-Cistina (Bioxon 266).

El medio, de un color café al principio pasa a rojo durante la incubación a 37°C: Los gérmenes que degradan la lactosa son inhibidos completamente, presentando algunas de las cepas no inhibidas, colonias verde amarillentas, opacas y rodeadas de un halo amarillento. Los microorganismos lactosa negativos, como *Salmonella* y ocasionalmente *Proteus*, forman colonias de color rosa pálido transparentes y rodeadas de un halo rojo brillante. Algunas colonias de *Proteus* forman colonias rojas.

Bibliografía:
American Public Health Association. Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater 11Th Edition APHA. New York. 1960.
American Public Health Association. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA. Inc. New York. 1958.

Agar Verde Brillante

Aislamiento de *Salmonella*

Cal. 145.1 450 9

Es un medio altamente selectivo empleado para aislar *Salmonella* (excepto *S. typhi* y *Shigellas*), de heces, orina, leche y productos lácteos y de otros alimentos de importancia sanitaria.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|----------------------------|------------|
| Extracto de Levadura. | 3.0 |
| Mezcla de Peptonas. | 10.0 |
| Cloruro de Sodio. Lactosa. | 5.0 |
| . Sacarosa. . | .10.0 |
| Rojo de Fenol Agar. . | 10.0 |
| Verde Brillante | 0.08 .20.0 |
| | .12.5 mg |

pH final 6.9 .:t. 0.2

Preparación:

Suspender 58 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y dejar remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

Recomendado especialmente en la detección de portadores y para estudios de control sanitario.

Tiosulfato de Sodio Clorato de Hierro y Amonio 6.80 0.80

pH final 7.4 ± 0.2

Agar de Vogel Johnson

Aislamiento y diferenciación de *Staphylococcus aureus*

Cal. 217-1 450 g

El Agar de Vogel Johnson permite una determinación temprana de las colonias de estafilococos coagulasa positivos y manitol positivos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|----------------------|--------|
| Peptona de Caseína. | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| Manitol . | 10 |
| Fosfato Dipotásico. | 5 |
| Cloruro de Litio. | 5 |
| Glicina. Agar. ... | 10 |
| Rojo de Fenol . | 16 |
| | .25 mg |

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación:

Suspender 61 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Enfriar a 45-50°C y agregar 20 ml de una solución de telurito de potasio al 1%. Agitar vigorosamente y vaciar en placas, utilizando unos 20 ml para cajas de Petri de vidrio y 15 ml para las de plástico.

Usos:

Las placas de agar pueden inocularse intensamente estriando con hisopos y se incuban a 35°-37°C. Las placas se examinan entre 24 y 30 horas, y generalmente también después de 48 horas en busca de *colonias negras* con *zonas amarillas*. Durante las primeras 24 horas la mayor parte de los microorganismos, excepto los estafilococos coagulasa-positivos están total o marcadamente inhibidos. A las 48 horas aparecen en el medio numerosos estafilococos coagulasa-negativos fermentadores y no fermentadores del manitol. *Staph. Epidermidis*, casi siempre inhibido, forma pequeñas colonias negro-grisáceas sin halo amarillo.

Los estafilococos coagulasa-positivos, forman pequeñas colonias negras en las placas rojas. Si hay fermentación de manitol, las colonias aparecen rodeadas por zonas amarillas debido a la formación del ácido del manitol. Si no hay fermentación del manitol, no se observa ninguna zona amarilla y el color del medio alrededor de las colonias puede ser aún más rojo de lo normal.

Excelente para la determinación de estafilococos coagulasa-positivos en los alimentos.

Bibliografía:
Vogel and Johnson, Public. Health lab. 18:131, 1960.
Zabovitz, Evars and Niven J. Bact. 70:687, 1955.

AgarXLD

Xilosa-Lisina Desoxicolato

Cal. 211-1 450 g

Para aislamiento de bacterias enteropatógenas, especialmente de los géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Arizona*.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--|-------|
| Xilosa | 3.50 |
| L-Lisina | 5.0 |
| lactosa . . | 7.50 |
| Sacarosa . . | 7.50 |
| Cloruro de Sodio, Extracto de ~c'adura. Rojo de Fenol. | 5.0 |
| Agar Desoxicolato de Sodio. | 3.0 |
| | 0.08 |
| | 13.50 |
| | 2.50 |

Preparación:

Suspender 55.9 del medio deshidratado en un litro de agua destilada y dejar que se remoje durante 10 a 15 minutos. Calentar con todo cuidado y agitando con frecuencia justamente hasta que el medio hierva. No sobrecalentar. Dejar de calentar en cuanto se obtenga la disolución completa del polvo. Una vez disuelto, enfriar rápidamente en agua o en baño maría a 50°C y verter en cajas de Petri. El medio debe ser transparente o casi transparente y tener un color rojo rubí anaranjado.

El calentamiento excesivo o el mantener el medio demasiado tiempo en baño maría a 50°C puede ocasionar que se formen precipitados. En este caso se corre el riesgo de que las colonias sean de menor tamaño y presenten reacciones menos nítidas. Sin embargo, el precipitado no perjudica el desarrollo bacteriano y puede eliminarse por filtración con papel filtro.

Usos:

En el Agar XLD es posible obtener las si

| CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS | |
|--|---|
| Arizona | Rojas y transparentes con centro negro |
| Citrobacter | Amarillas y opacas. Pueden presentar un centro negro y orillas claras. |
| Edwardsiella | Rojas con el centro negro y bordes claros. |
| <i>E. coli</i> , Enterobacter, Serratia | Amarillas y opacas. Halo de precipitado amarillo alrededor de las colonias. |
| Klebsiella | Grandes amarillas pálidas, mucoides y opacas. Halo de precipitado amarillo rodeando a la colonia. |
| <i>P. vulgaris</i> | Amarillas transparentes con bordes claros. |
| <i>Proteus morganii</i> y <i>P. rettgeri</i> | Rojas y transparentes |
| Providencia y Shigella | Rojas y transparentes |
| Salmonella | Rojas transparentes y bordes amarillos con centro negro si producen H ₂ S. Sin centro negro si no son productoras de H ₂ S. |
| Bibliografía: Taylor A.J. Clin. Path 44:471, 1965 Taylor and Harris A.J. Clin. Path. 44:476. 1965. | |

Base de Agar Sangre

Aislamiento, cultivo y actividad hemolítica de gérmenes difíciles

Cal. 201.1

450 g

La Base de Agar Sangre es adecuada para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento. Al añadir sangre, puede usarse para descubrir la actividad hemolítica y para aislar bacilos tuberculosos.

fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|------------------------------|-----|
| Infusión de Músculo Cardíaco | 375 |
| Peptona de Carne | 10 |
| Agar | 15 |
| Cloruro de Sodio | 5 |

pH final 7.3 ±0.2

Preparación:

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar entre 5 y 10 minutos. Hervir durante un minuto. Los matraces pueden taparse y colocarse directamente en autoclave. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Después de esto enfriar a 45-50°C y añadir de 5 a 10% de sangre desfibrinada estéril, homogenizar y vaciar en cajas de Petri estériles. No es recomendable emplear sangre humana. De preferencia utilice sangre de cordero o de conejo.

También es posible inocular el fondo de una caja de Petri estéril con un pequeño inóculo, y vaciar posteriormente el medio fundido a unos 50°C; la caja se hace girar suavemente para homogenizar la muestra.

En algunos laboratorios se emplea el medio de cultivo preparado en tubos con tapón de rosca que se pueden inocular (a 45°C) y posteriormente vaciar en cajas de Petri estériles.

Usos:

Para el aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis*, la Base de Agar Sangre con 0.1 % de glicerol, 2.5 % de sangre humana de banco de sangre y 100 unidades de Penicilina por mililitro ha dado resultados comparables con los del medio de Lowenstein-Jensen. Otra forma que ha sido propuesta por Tarshis y Frisch consiste en preparar gelosa sangre con 25% de sangre de banco y 1 % de glicerol. Este medio era satisfactorio para el cultivo de *M. tuberculosis* a partir de inóculos pequeños y daba resultados equiparables a otros tres medios usualmente empleados para este propósito.

La Base de Agar Sangre también puede usarse para la preparación de antígenos.

Bibliografía:

Snaveylanél Brahier A.J. Clin. Path. 33:511, 1960. Hosty, Freeman and Irwin. Public. Health. Lab., 1953. Schubert, Edwards and Ramsey J. Bacl. 77:648, 1959. APHA Diagnostic Procedures and Reagents 3rd edition. 1951. Tharshis and Frish AM. J. Clin. Path. 21:101, 1951.

Con la adición de uno por ciento de glicerol y de 15 a 20 % de sangre humana de banco de sangre, se obtiene un buen desarrollo de bacilos tuberculosos.

Fórmula aproximada en gramos p'or litro:

| | |
|-------------------------------|-----|
| Inclusión de Músculo Cardíaco | 375 |
| Peplona de Carne | 10 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Agar | 15 |

pH final 6.8 ±0.2

Preparación:

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar durante 5 minutos y mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Los matraces pueden taparse y colocarse directamente en el autoclave. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Después de esterilizar hacer rotar los matraces y enfriar a unos 45°C. Añadir de 5 a 10% de sangre estéril desfibrinada de carnero o de conejo, y vaciar en cajas de Petri estériles.

Usos:

La Base de Agar con bajo pH se recomienda como un medio para el cultivo de varios microorganismos de difícil crecimiento. La adición de 5 a 10% de sangre estéril desfibrinada proporciona un medio excelente para el aislamiento de pneumococos, gonococos, meningococos. También está indicado para estudiar reacciones de hemólisis.

Para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, la base de Agar Sangre con 0.1 % de glicerol, 2.5% de sangre humana y 100 unidades de Penicilina por mili litro dió resultados comparables al medio de LowensteinJensen. (Tarshis).

Bibliografía:

Frisch and Tarshis A. Rev. Tuberc. 64:55, 1951. Tarshis and Weed A. Rev. Tuberc. 67:391, 1953. Tarshis J. Bacl. 67: 117, 1954.

Base de Agar Sangre con bajo pH

Aislamiento y diferenciación de bacterias exigentes con actividad hemolítica.

Cal. 219.1 450 g

La Base de Agar de Sangre con bajo pH es un agar de infusión de corazón con un pH de 6.8. Se usa en la misma forma y para los mismos fines que la Base de Agar Sangre.

Caldo Tioglicolato (NIH)

Prueba de esterilidad de productos biológicos y farmacéuticos

Cal 132-1 450 9

También se conoce como caldo para pruebas de esterilidad y se puede usar en lugar del Medio Líquido de Tioglicolato, para el análisis de esterilidad de productos farmacéuticos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-----------------------|------|
| Peptona de Caseína | |
| Extracto de Levadura | 15.0 |
| Dextrosa | 5.0 |
| Cloruro de Sodio | 5.0 |
| Tioglicolato de Sodio | 2.5 |
| L.Cistina | 0.5 |
| | 0.5 |

pH final 7.1 .:t. 0.2

Preparación:

Suspender 28.5 9 del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente. Hervir hasta disolución. Distribuir en tubos de fermentación o en recipientes adecuados. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 18 minutos.

Para obtener mejores resultados debe prepararse sólo unos días antes de usarlo, ya que es realmente inestable y se oxida rápidamente.

Está elaborado de acuerdo a la fórmula del "National Institute of Health", y de la USP.

Bibliografía:
U.S. Pharmacopea XVI. 1960.

Caldo de Todd - Hewitt

Cultivo de Estreptococos B-hemolíticos para tipificación serológica

Cal 206-1 450 9

El Caldo de Todd-Hewitt fue originalmente desarrollado para la producción de hemolisina estreptocócica. El caldo modificado por Updyke y Nickle se emplea de preferencia para el cultivo de estreptococos beta hemolíticos, especialmente para estudios de tipificación serológica.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Infusión de músculo cardíaco | 500.0 |
| Peptona | 20.0 |
| Dextrosa | 2.0 |
| Cloruro de Sodio | 2.0 |
| Fosfato disódico Carbonato de Sodio | 0.4 |
| | 2.5 |

pH final 7.8 .:t. 0.2

Preparación:

Disolver 30 9 del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Usos:

El Caldo de Todd Hewitt se usa en los estudios de agrupamiento y tipificación serológicas de estreptococos beta hemolíticos, para su identificación en estudios clínicos y epidemiológicos.

Para la elaboración del agar de Todd Hewitt se añaden de 13 a 15 9 de Agar Bacteriológico por litro de medio de cultivo.

Bibliografía:
Todd and Hewitt J. Path. 1. Bacl. 35:973. 1932.
Updyke and Nickle. Applied. Microbio!. 2:117. 1954.
Diagnostic Procedures and Reagents.
Cuarta Edition APHA, Inc. New York, 1963.
Noody, Slegel, Pittman and Winler. AJPH. 53:1083. 1962.

Caldo de Trypticaseína y Fosfato

Hemocultivo de bacterias exigentes

Cat 225-1 450 9

El Caldo de Trypticaseína y Fosfato es un medio que se recomienda para el desarrollo de estreptococos, pneumococos, meningococo-I cos y otros microorganismos de difícil crecimiento.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

| | |
|--------------------|-----------------------|
| Peplona de Caseína | 20 |
| Dextrosa | ~ |
| Cloruro de Sodio | 2r |
| Fosfato Disódico | 5, |
| | 0 |
| | 2,; |
| | pH final 7.3 .:t. 0.2 |

Preparación:

Disolver 29.5 9 del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Usos:

Este medio está especialmente adaptado para hemocultivos: un procedimiento frecuente es la inoculación de 1 O mi de sangre a un frasco o matraz con 150 mi del medio de cultivo. El frasco se incuba a 35-37°C, se observa a diferentes intervalos de tiempo. Cuando se obtiene el desarrollo, se transfieren los microorganismos a un medio sólido para hacer el aislamiento e identificación de los mismos.

Bibliografía:
Diagnostic, Procedures and Reagents. 3rd. Edition.
16:1950. J. Milk and Food Tech. 13:226. 1950.

