DEPARTAMENTO DE APOYO AL DIAGNOSTICO

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

GUIA DE PROCEDIMIENTOS

MICROBIOLOGICOS

CULTIVO DE HECES

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. CHERO H.

CONTENIDO

Introducción..... 3
Objetivo..... 4
Campo de aplicación..... 4
Medidas de bioseguridad..... 4
Descripción..... 5
Utilidad clínica..... 5
Obtención de la muestra..... 6
Materiales..... 6
Aislamiento de Escherichia coli..... 10
Aislamiento de Genero Shigella..... 11
Aislamiento de Genero Salmonella..... 13
Aislamiento de Genero Campylobacter..... 15
Prueba de Sensibilidad de Antibioticos..... 18
Aislamiento Vidrio Cholereae..... 22
Bibliografía..... 25

R. RAMOS M

A. ROJAS

L. GALVEZ C.

A. C[illegible] H.

INTRODUCION

Las enfermedades gastrointestinales ocupan una de las primeras causas de consulta médica y son también una de las principales causas de muerte en el Perú y en el mundo. Puede afectar a todos sin importar edad ni condición social, aunque los niños pequeños y los ancianos son el grupo más vulnerable. Las causas más comunes son bacterias, virus o parásitos patógenos que ingresan al cuerpo por vía fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados principalmente con materia fecal.

Las diarreas infecciosas continúan siendo un gran problema en los paises en desarrollo, ocupando altas tasas de morbilidad y mortalidad. Hasta hace poco tiempo solo era posible conocer su etiología en un porcentaje de casos relativamente bajo. Sin embargo en los últimos años, con la aplicación de nuevas metodologías, se pudo incluir dentro del espectro de agentes microbianos a "nuevos enteropatógenos" como son los Rotavirus, Criptosporidium, Aeromonas y las especies termófilas de Campylobacter, con lo cual se ha podido identificar el agente causal en el 40-50% de los casos de diarrea.

Para el diagnostico preciso del origen de la infección y su consecuente tratamiento, es necesario realizar pruebas de laboratorio. El presente manual tiene como finalidad definir los procedimientos y pasos a seguir para realizar el Cultivo de heces.

El Cultivo de heces (coprocultivo) es el método indicado para el aislamiento e identificación de bacterias enteropatógenas. Estos pertenecen principalmente a la familia Enterobacteriaceae y se reconoce a los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* y *Plesiomonas;* la familia vibrionaceae con los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* y la familia Campylobacteriaceae con el genero *Campylobacter*.

Esta prueba hecha en la muestra de heces proporciona información significativa que puede ayudar en el diagnóstico diferencial de la enfermedad gastrointestinal y orientar el manejo médico o para continuar la evaluación mediante otras pruebas más específicas o exactas.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. CALVEZ C.

A. Cueto H.

CULTIVO DE HECES
(COPROCULTIVO)

Objetivo del manual: Estandarizar los procedimientos para realizar el Cultivo de heces.

Campo de aplicación: Este manual se seguirá para cualquier muestra de heces que ingrese al Laboratorio de Microbiología del HSJL con solicitud del examen Cultivo de heces.

Medidas de bioseguridad: El personal involucrado en la ejecución de este examen debe cumplir los requisitos y aplicar las medidas establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad (Serie de Normas Técnicas Nº 18 - INS).

- La bioseguridad es responsabilidad del jefe de laboratorio y del trabajador del laboratorio, este tiene la obligación de capacitar y capacitarse respectivamente
- Manipular con guantes la obtención, recepción y tratamiento de las muestras frescas.
- Cambiar los guantes de látex toda vez que hayan sido contaminados, lavarse las manos y ponerse guantes limpios.
- Considerar como material de alto riesgo las muestras frescas y de pacientes con VIH.
- Vestir siempre mandil dentro del laboratorio y quitárselo para transitar por otras áreas.
- El área de trabajo debe ser una sola dentro del laboratorio.
- Informar inmediatamente a su superior de cualquier accidente ocasionado con elementos del laboratorio.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

COPROCULTIVO

PREANALITICO

OBTENCION DE LA MUESTRA:
La muestra de heces de un paciente sospechoso de patología gastrointestinal debe recolectarse antes de la administración de antibiótico.
Cuando las deposiciones son evacuadas en un recipiente la muestra se puede obtener directamente de esta con un hisopo.

La muestra que van a ser referidas se obtiene con un hisopo de algodón previamente esterilizado, se lubrica previamente introduciéndolo en el medio de transporte y luego se introduce en el recto unos 3 cm, realizando movimientos de rotación, luego se introduce el hisopo en el fondo del tubo del medio de transporte que puede ser el de Cary y Blair o el de Amies.

NO SE DEBE REFRIGERAR LA MUESTRA.

ROTULACION Y TRANSPORTE
En la etiqueta de cada recipiente o tubo se debe poner el nombre del paciente o código que identifique la muestra y debe ir acompañada de la microbiología a realizarse. Se debe escribir el mismo código tanto en el tubo del medio de transporte como en la ficha que lo acompaña.

PROCESO

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO:

Caldo Selenito: Salmonella
Shigella
Incubar a 18-24 horas a 37° c
Agua Peptonada: Vibrio cholerae
Incubar a 18-24 horas a 37° c

SIEMBRA PRIMARIA:

Fam Enterobacteriaceae — Fam.Vibrionaceae
Mac Conkey — TCBS
XLD DC
Siembra en estria e incubar por 18-24 horas a 37° c

SIEMBRA A PARTIR DE MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO

Del Caldo Selenito a SS Agar e incubar por 18-24 hs. a 37°c
Del Agua Peptonada a TCBS e incubar por 18-24 hs. a 37° c

R. RAMOS M
A. ROJAS
L. GALVEZ C.
A. Calero H.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las colonias sospechosas en las placas de siembra directa así como del enriquecimiento serán transferidas a los medios de diferenciación bioquímica primaria.
Se indica el uso de dos medios:

- Triple Azúcar Fierro (TSI)
- Agar Lisina Fierro (LIA)

Las pruebas de diferenciación bioquímica son numerosas, se debe considerar las de selección rápida, base para la identificación de las enterobacterias.

Inoculación de los medios TSI y LIA

- Tener la seguridad de que los tubos de **TSI y LIA** serán inoculados con la misma colonia.
- Punzar una sola vez en el medio TSI, introduciendo el alambre por el centro hasta tocar el fondo del tubo, terminando en estria en la superficie inclinada.
- Con el resto de la asada, punzar tres veces el medio de LIA hasta el fondo del tubo, terminando en estría en la superficie inclinada.
- Colocar la tira de papel indol en la boca del tubo de LIA, sin tocar el agar.
- Incubar los tubos a 35°-37° c por 18-24 horas

Lectura, simbolización e interpretación del TSI y LIA

TSI: El color del medio es rojo ladrillo ph 7.4

- La producción de Hidrógeno sulfurado se visualiza por el color negro en el medio. Se simboliza por la intensidad (1 + a 4 +).
- La acidez: El medio cambia a color amarillo y se representa con la letra A.
- La alcalinidad: El medio cambia a color grosella y se representa con la letra K.

LIA: El color del medio es ligeramente azulado (ph 6.7)

- La alcalinidad del medio hace que el color azul se torna más intenso.
  Si reacciona es Lisina + se representa K/K (LDC +).
- La acidez del medio se nota en la parte inclinada cuando varia al color rojo ladrillo, el fondo vira a amarillo.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Calero H.

Esta reacción es Lisina + se representa R/A (LDA +).

- Cuando no produce ninguna de las reacciones, el medio LIA se observará azulado en la parte inclinada y amarillo en el fondo por fermentación de la glucosa. Se representa K/A.
- A veces el medio puede presentarse amarillo en su totalidad, simbolizándose A/A.
- Estas dos últimas lecturas también se interpretan como Lisina Negativa.
- La reacción del indol es POSITIVA por la aparición del color rosado violacio en la tira de papel de filtro, que se colocó previamente en la boca del tubo, se simboliza con la reacción en LIA.
- Si no hay ninguna variación en el LIA se representará N/N también será negativo y se puede afirmar que se trata de un germen que no pertenece a las Enterobacterias.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Escherichia coli.

CARACTERISTICAS DEL GENERO Escherichia.

Son bacilos cortos
Gram negativos
Su hábitat natural es el intestino, forman generalmente parte de la flora.
Generalmente Lactosa positiva.

ESPECIES DE Escherichia coli.

Escherichia coli enteropatógena o serotipo EPEC
Se han encontrado algunas que producen fiebre, diarrea liquida con gran cantidad de moco, generalmente sin leucocitos fecales.
La unión de EPEC a las células es infectante como para poder desencadenar el cuadro, no existe invasión subsiguiente:
Se utilizan pruebas serológicas, además: Histocultivo con células Hepa y Prueba de DNA para identificar genes que permiten adhesión a las células.

Escherichia coli enterotoxigenica (ETEC)
Comprende ciertas cepas de E.coli productoras de enterotoxinas. Coloniza las paredes del intestino delgado elaborando la enterotoxina termolábil y termoestable.
La diarrea que se produce es líquida, voluminosa y sin sangre y es la mayor causa de diarrea infantil.

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)
Comprende ciertas cepas de E.coli causante de diarrea invasiva de forma disentérica, son muy semejantes a Shigella, e igualmente su patógenicidad radica en invadir y proliferar dentro de los enterocitos del intestino delgado distal y del colon causando una muerte eventual de la célula, la capacidad invasiva está dada por un plásmido.

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. Calero H.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)
El síndrome se llama enterocolitis hemorrágica. Son productoras relativamente de toxinas potentes que pueden ser causa de diarrea con sangre.
Producida por E. coli serogrupo O 157:H7

Escherichia coli vorotóxica (VEC)
Son las que ataca a las células vero y están asociada con la E. coli O119

MEDIOS DIFERENCIALES PARA IDENTIFICACION DE

Escherichia coli

Tipo de cepas	TSI	Gas	H_2S	LIA	Indol
Anaerogenicas (Sin gas)	A/A ó K/A	- (aust)	- (aust)	K/K o K/A	+ (presente)
Aerogenicas (Con gas)	K/A ó A/A	++ (prest)	- (aust)	k/k ó K/A	+ (presente)

En TSI:

A/A: El ataque de lactosa y/o sacarosa se manifiesta por el cambio total del medio al color amarillo.

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Calero H.

K/A: Significa alcalinidad en la inclinación y acidez en el fondo (ataque de glucosa)

En LIA:

K/K: Lisina positiva, significa alcalinidad en todo el medio por decarboxilación.

K/A: Lisina negativa, significa alcalinidad en la inclinación, acidez en el fondo por desaminación.

A partir del TSI o TSA se realizan otras pruebas: Urea, Citrato, Movilidad, SIM, Azúcares, Aminoácidos.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO	%
INDOL	POSITIVO	96.6
H_2S	NEGATIVO	0.0
UREA	NEGATIVO	0.0
CITRATO	NEGATIVO	0.2
MOVILIDAD	VARIABLE	69.1
MR	POSITIVO	99.9
VP	NEGATIVO	0.0
GELATINA	NEGATIVO	0.0
FERMENTACION GLUCOSA(acido)	POSITIVO	100.0
FERMENTACION GLUCOSA(GAS)	POSITIVO	90.8
LACTOSA	VARIABLE	

DETECCION DE Escherichia coli enteropatógena EPEC.

De acuerdo al grupo:
Se determina la presencia de EPEC mediante pruebas Serológicas con Antigeno somático (O), por la exposición a los sueros inmune anti-coli Polivalente A, B, C.

Aglutinación en lámina de vidrio:

a. Preparar una suspensión bacteriana homogénea, tomando una asada del TSI o TSA y disolviendo en una gota de Solución Salina Formolada (antígeno). No proseguir con la prueba si hay muestra de autoaglutinación.
b. Colocar frente a la suspensión una gota de suero (0.02 ml) inmune polivalente anti-coli A, B, C.
c. Mezclar ambas gotas, moviendo la lámina en vaivén aproximadamente por 15 veces para una mezcla óptima y realizar la lectura.
d. Si se aprecia la reacción de la aglutinación se considera positivo y queda determinado el grupo.
e. Si la muestra no aglutinara, con ningún suero polivalente, no estaríamos frente a E.coli EPEC.

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. Cellero H.

LECTURAS	POLIVALENTE A	POLIVALENTE B	POLIVALENTE C
EPEC A	+	-	-
EPEC B	-	+	-
EPEC C	-	-	+

De acuerdo al antígeno somático (O).

Una vez determinado el grupo se realiza otras pruebas serológicas por aglutinación en lámina de vidrio (de acuerdo al procedimiento anterior) para determinar los serotipos específicos probándoles con cada uno de los antígenos somáticos de cada grupo:

POLIVALENTE A	POLIVALENTE B	POLIVALENTE C
026	086	018
055	0119	0114
0111	0125	0142
0128	0126	0158
	0127	

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL GENERO Shigella

Bacilos cortos, gram negativos.
No forman esporas.
No presentan flagelos.
Sus necesidades nutritivas no son complejas.
No fermentan la lactosa.
Son anaerobios facultativos.

Colonias sospechosas de Shigella en medio primario.

Agar XLD : Colonias pequeñas de color rojo.

Agar DC : Colonias pequeñas traslúcidas e incoloras.

Agar EMB : Colonias traslúcidas e incoloras.

Agar SS : Colonias traslúcidas e incoloras.

El esquema antigénico de Shigella se ha dividido en 4 grupos serológicos.

A: Shigella dysenteriae, comprende 12 serogrupos. Los más comunes son del 1 al 7, los más frecuentes son: A2 y A3.

B: Shigella flexneri, comprende 6 serogrupos. Los más frecuentes son B2a, B3a y B6.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

C: Shigella boydii, comprende 18 serogrupos. Distribuido del 1 al 7, 8 al 15 y 16 al 18. Los más comunes del 1 al 7 y los más frecuentes son C1 y C2.

D: Shigella sonnei, comprende 2 serogrupos DI y DII, el más frecuente D1.

Identificación Bioquímica.
Lectura de las reacciones bioquímicas:

TSI	K/A
GAS DE GLUCOSA	NEGATIVO
H_2S	NEGATIVO
LIA	K/A
INDOL	VARIABLE

A partir del TSI o TSA se realizan otras pruebas como:

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESULTADO
INDOL	VARIABLE
H_2S	NEGATIVO
UREA	NEGATIVO
CITRATO	NEGATIVO
MOVILIDAD	NEGATIVO
MR	NEGATIVO
VP	NEGATIVO
GELATINA	NEGATIVO
FERMENTACION DE GLUCOSA (acido)	POSITIVO
FERMENTACION DE GLUCOSA(GAS)	NEGATIVO
LACTOSA	NEGATIVO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE SALMONELLAS.

Las infecciones por Salmonella son casi siempre por ingestión de bacterias, generalmente con agua, leche, alimentos contaminados.

Hay dos tipos de enfermedad; La gastroenteritis aguda caracterizada por vómitos y diarrea en la que algunos pacientes se hacen septicémicos con ligera hipertermia y recuperación rápida y la tifoidea con fiebre continúa en la cual la bacteriemia ocurre en etapa inicial y los síntomas son más generales.

Las pruebas que se realizan para el Aislamiento e Identificación de Salmonellas, son expuestas a continuación, realizándose cada una de ellas en orden secuencial de la manera siguiente:

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

1. La muestra se obtiene con hisopo rectal.

Otras Salmonellas K/A ++ ++++ K/A -

---

5. **PRUEBAS SEROLOGICAS:**

5.1 Pruebas Serológicas con Antígeno somático (O)

Exposición a los sueros inmune anti-Salmonella:

- Polivalente A-E
- Individuales: A, B, C1, C2, D, E.

Se busca aglutinación en lámina de vidrio:

- Utilizando el antígeno, se prepara una suspensión (Se toma una asada de cultivo de TSI o TSA y se disuelve en una gota de Solución Salina Formolada) más una gota de suero (0.02 ml) inmune anti-salmonella.
  Mezclar ambas gotas y realizar movimientos de vaivén (aproximadamente 15 veces).

- Si se aprecia la reacción de la aglutinación se considera positivo, y queda determinado el grupo de acuerdo al antígeno somático (O).
- Si la muestra no aglutinara con ningún suero, ni con el suero polivalente A-E, no estaríamos frente a una Salmonella.

Una vez obtenida la muestra, se introduce en el espesor del medio de Cary y Blair hasta el fondo del tubo. En estas condiciones, el microorganismo patógeno permanece viable por varios días a temperatura ambiente.

2. El medio de enriquecimiento es necesario para Salmonella. El Caldo Selenito, permite el crecimiento de Salmonella typhi.
   El medio de selenito oxidado, manifestado por el color rojizo, tiene capacidad inhibidora, por lo cual no debe ser usado.
   Introducir el hisopo en el tubo con caldo selenito e incubar a 37° c por 18-24 hrs.
3. Siembra en Medio Selectivo SS (agar) por agotamiento.
   Incubar a 37° c por 24 horas.
   Observar crecimiento de colonias pequeñas transparentes inclusive colonias con producción de Hidrógeno Sulfurado.
   Tomar las colonias pequeñas y transparentes para sembrar en TSI-LIA.
4. Pruebas preliminares en Medios Diferenciales; TSI LIA INDOL.
   Sembrar en TSI-LIA colocando tira de Indol e incubar a 37° c, lectura a las 24 horas.

	TSI	GAS	H_2S	LIA	INDOL
Salmonella typhi	K/A	-	+	K/K	-
Salmonella Paratyphi	K/A	+	-	K/A	-

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Cifuentes H.

En el caso de Salmonella typhi, si no aglutinara con el antígeno Vi se procederá a romper la cápsula, sometiendo a la bacteria que se encuentra en el tubo que contiene TSI en agua 100°c por 30 minutos.

Resultados:

Salmonella typhi	Salmonella paratyphi	Otras Salmonellas
Polivalente +	Polivalente +	Polivalente +
D +	A +	+
V +		

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE

CAMPYLOBACTER

Actualmente se considera como causa principal de la diarrea en humanos al grupo Campylobacter jejuni/coli.
Son bacilos finos, Gram-, con forma de coma (,) de ese (S), de gaviota en vuelo (ll), alargado y espirilado (l) y en cultivos viejos (48 hr. a más) forma cocoide. Son pequeñas de 0.5- 8.0 cm de largo por 0.2-0.5 cm. de ancho.

DIAGNOSTICO.

1. MICROSCOPIA:

   - Tinción Gram o Gram "Interrumpido"
   - Microscopía de campo oscuro o contraste de fases.

2. CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

   - Obtención de muestras en Medio Cary y Blair Cado.
   - Medios selectivos: Agar Campy-BAC.
   - Incubación de las placas en ambiente de microaerofilia en campana con velita encendida.
   - Identificación Primaria: Oxidasa, Catalasa, Gram, mormativilidad.
   - Identificación confirmativa: Agar TSI, glicina 1% CINa 3.5% Crecimiento a 37□c y 42□ c, susceptibilidad al acido nalidixico y a la cefalotina.

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Calero H.

COLORACIONES PARA CAMPYLOBACTER

COLORACION GRAM.

- Prepare un frotis de la muestra.
- Cubra con cristal violeta por un minuto luego lave con agua corriente.
- Vierta la solución de yodo y déjela por un minuto.
- Escurra la solución y lave con agua corriente.
- Decolore con alcohol acetona por un minuto.
- Lave con agua corriente y escurra.
- Cubra con la solución de safranina por 10 segundos.
- Lave con agua y déjelo secar.

COLORACION GRAM "INTERRUMPIDO"

- Hacer un frotis a partir de la muestra de heces, fijar.
- Colorear con la solución de cristal violeta del gram, dejar secar por 2 a 3 minutos.
- Escurrir y lavar con agua.
- Cubrir con la solución de lugol del gram por 2 a 3 minutos.
- Escurrir, lavar y secar.

COLORACION DE VAGO.

- Fijar en alcohol de 95%
- Colorear con eosina al 2% durante 4 minutos
- Lavar con agua de caño
- Colorear con cristal violeta según técnica de Gram modificada por Hucker durante dos minutos.

COLORACION DE VAGO (Modificado)

- Extensión de la muestra, secar no fijar.
- Recubrirla de una solución, filtrada de mercuriocromo al 2% en agua destilada.
- Dejar actuar por 3 a 5 minutos
- Colorear 5 minutos con una solución acuosa al 2% de violeta de metilo filtrado (Esta solución se prepara añadiendo agua muy caliente al colorante triturado en el mortero).
- Lavar y secar.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

PRUEBAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACION CONFIRMATIVA DE ESPECIES DE CAMPYLOBACTER

PRUEBA	C. JEJUNI	C.COLI	C.LARI
OXIDASA	+	+	+
CATALASA	+	+	+
MOTILIDAD	+	+	+
ACIDO NALIDIXICO(AN)	S	S	R
CEFALOTINA	R	R	R
CRECIMIENTO TSI(glu,lac, H_2S	-	-	-
CRECIMIENTO ENGLICINA AL 1% ClNa 3.5%	+	+	+
CRECIMIENTO 25ºC	-	-	-
CRECIMIENTO 36ºC	+	+	+
CRECIMIENTO 42ºC	+	+	+
HIDROLISIS DEL HIPURATO	+	-	-

.MEDIO DE TRANSPORTE CARY Y BLAIR

Agua destilada 991 ml
Cary y Blair (DIFCO) 12.5 g
Antimicrobiano de Skirrow 1 ampolla /500 ml de medio

MEDIO SELECTIVO CAMPY-BAP

Agar Brucella (Base) 450 ml
Sangre desfibrinada de carnero 50 ml
Fórmulas antimicrobiana de Butzler (OXOID) 1 ampolla /1.5 ml de agua destilada estéril + 1.5 ml etanol.

MEDIO GLICINA AL 1%

Caldo Brucella 100 ml
Agar-Agar 0.16 g
Glicina 1 g
Repartir en tubos de 13 x 100 con tapa rosca y autoclavar por 15' lbs de presión y T° 120° C.

MEDIOS ClNa al 3.5%

Caldo Brucella 100 ml
Agar Agar 0.16 g
ClNa 3.5 g

(Se le resta el ClNa incorporado en el Caldo Brucella)
De modo similar al anterior se reparte en tubos de 13 x 100 con tapa rosca a razón de 4 ml. por tubo que luego se autoclavan.

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. Calero H

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

METODO DE SUCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS POR MEDIO DE DISCOS (KIRBY-BAUER)

MEDIOS A USAR:

- Agar Mueller Hinton (Repartir en placas)
- Caldo de Mueller Hinton (Repartir 5ml. en tubos)

PREPARACION DEL INOCULO:

- Tomar con un asa de alambre una porción de cultivo puro (TSI) y sembrar en el caldo de Mueller Hinton.
- Incubar la suspensión por un periodo de 2-3 horas, hasta obtener una turbidez comparable al standard 0.5 de Mac Farland (equivale a una concentración aproximada de 10 organismos por ml).
  Si la suspensión está muy concentrada diluir con suero fisiológico.

INOCULACION DE LAS PLACAS:

1. Introducir un hisopo estéril en el caldo.
2. Elevar el hisopo sobre la superficie del caldo y rotar contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo.
3. Frotar la superficie del agar con el hisopo en tres direcciones.
4. Dejar secar por 5 minutos con la placa cerrada.
5. Colocar los discos de sensibilidad con pinza estéril. Los discos deben estar suficientemente separados para hacer la lectura.
6. Presionar suavemente los discos para asegurar su implantación en la superficie.
7. Incubar a 37□c por 18-24 horas.

MEDICION DE HALOS:

- Las zonas de inhibición se miden sobre fondo oscuro y por la parte posterior de la placa sin abrirla.
- Después de la medida proceder a comparar con la tabla de interpretación.

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Ortiz H.

MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES QUE NO NECESITAN AUTOCLAVAR

MEDIOS	PH	INHIBIDOR	AZUCAR	INDIC.
Caldo ó MERCK	7.0 ± 0.2	Selenito	Lactosa - Selenito	
S-S Agar (MERCK)	7.0 ± 0.1	Tiosulfato	Lactosa Rojo Verde Brillante Sales Biliares Citrato Férrico Amoniacal	Neutro
XLD Agar (MERCK)	7.4 ± 0.1	Amonio	Lactosa Rojo Xilosa Sacarosa	Fenol
TCBS Agar (EIKEN)	8.6	Tiosulfato Colato Sodico Timol Bilis de buey	Sacarosa Azul de Citrato	Azul de Bromotimol

MEDIOS DE CULTIVO QUE NECESITAN AUTOCLAVAR

MEDIOS	PH	INHIBIDOR	AZUCAR	INDICADOR
Caldo Peptonado Alcalino	8.6	-.-	-.-	-.-
Cary y Blair (DIFCO)	8.4 ± 0.2	-.-	-.-	-.-
Mc Conkey 7.1 ± (MERCK)	Sales	Lactosa 0.1	Rojo	Biliares Neutro Cristal

APOYO AL DIAGNOSTICO HOSPITAL - S.E. V°B°
UNIDAD DE GESTION DE LA CALIDAD HOSPITAL SANJUAN DE LURIGANCHO V°B° R. RAMOS M.
ASESORIA JURIDICA Hospital San Juan de Lurigancho V°B° A. ROJAS
OFICINA DE ADMINISTRACION JEFATURA V°B° K. GALVEZ C.
SUB GERENCIA IGSS V°B° A. Calero H.

				Violeta	
TSI (MERCK)		7.4 ± 0.1	-.-	Lactosa Sacarosa Glucosa	Rojo de Fenol
LIA (BBL)	0.2	6.7	-.-	Glucosa	Púrpura de Bromocresol
Urea (MERCK)		6.8 ± 0.1	-.-	Glucosa	Rojo de Fenol
SIM (BBL)	0.2	7.3 ±	-.-	-.-	-.-
Citrato (BBL)	6.9 ± 0.2		-.-	-.-	Azul de Bromotimol
TSA (DIFCO)	0.2	7.3 ±	-.-	-.-	-.-
MEDIO SELECTIVO CAMPY-BAP	0.2	7.0 ±	Formula antimicrobde Butzler	Glucosa	
Caldo M-H (DIFCO)	0.1	7.3 ±	-.-	-.-	-.-
Agar M-H (DIFCO)	0.1	7.3 ±	-.-	-.-	-.-

AISLAMIENTO PARA VIBRIO CHOLERAE.

El cólera es una infección intestinal aguda causada por el **Vibrio cholerae**, el que posee una enterotoxina termolábil que produce diarreas acuosas profusas (como agua de arroz), sin moco, ni sangre, acompañada de vómitos y calambres, pudiendo ocasionar una deshidratación severa, hipotensión, muchas veces shock y a veces la muerte. Los casos epidémicos son causados por el Vibrio cholerae serogrupo 01, biovar El tor. El cólera existe en forma endémica en algunos países de Asia y Africa con condiciones de salubridad muy deprimidas, y desde Enero de 1991 se viene presentando un brote epidémico en el Perú dentro de la séptima pandemia.

En el diagnóstico de laboratorio del cólera se deben considerar los siguientes aspectos:

a. El envío de muestras desde cualquier establecimiento de salud que no tenga servicio de laboratorio de microbiología.

b. El cultivo para el aislamiento del Vibrio cholerae en los laboratorios locales (Centro de Salud, Hospitales, Clínicas, Institutos especializados), y el envió de los cultivos sospechosos al Instituto Nacional de Salud (Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos) para la confirmación y serotipificación.

c. La confirmación, serotipia y pruebas especiales para la identificación final en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos (LANARE), Instituto Nacional de Salud, Lima.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Ca

2. ALCANCE.

Esta norma describe el equipamiento, material de laboratorio, medios de cultivo y procedimientos necesarios para que los laboratorios de Microbiología de los Centros de Salud, Hospitales, Institutos especializados u otras Instituciones del Sector Salud puedan realizar el aislamiento y la identificación de **V.cholerae.**

3. TOMA Y ENVIO DE LA MUESTRA.

3.1 Obtención de la muestra:

La muestra de heces de un paciente sospechoso de cólera debe recolectarse antes de la administración de cualquier antibiótico.
La muestra se obtiene con un hisopo de algodón previamente esterilizado, el cual se desenvuelve de su protección de papel, se lubrica previamente introduciéndolo en el espesor del medio de transporte y luego se introduce en el recto unos 3 cms, imprimiendo movimientos de rotación, tratando de obtener una pequeña cantidad de muestra. Una vez obtenida ésta, se introduce el hisopo hasta el fondo del tubo que contiene el medio de transporte que puede ser el de Cary y Blair o el de Amies. En estas condiciones el microorganismo patógeno permanece viable hasta por 4 semanas a temperatura ambiente.
Cuando las deposiciones son evacuadas en un recipiente la muestra se puede obtener directamente con el hisopo.

NO SE DEBE REFRIGERAR LA MUESTRA.

En la etiqueta de cada tubo se debe poner el nombre del paciente o código que identifique la muestra y debe ir acompañada de una ficha clínico-epidemiológica, con los datos del paciente. Se debe escribir el mismo código tanto en el tubo de medio de transporte como en la ficha que lo acompaña.
Si el procesamiento de la muestra va a realizarse en el mismo día, se puede enviar una muestra de heces (1 a 3 ml o media cucharadita) en un frasco limpio o tomar la muestra y ponerla directamente en un medio de enriquecimiento como es el caldo peptonado. En estos casos tampoco debe refrigerarse la muestra.

3.2 **Envío de las muestras:**

Las muestras deben ser enviadas al Hospital más cercano que cuente con servicio de Microbiología, el mismo que debe encargarse de proporcionar los medios de transporte a sus centros periféricos.

4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

La técnica para el diagnóstico bacteriológico del cólera no se diferencia mucho de la que se emplea para el aislamiento de bacterias de la familia **Enterobacteriaceae** y se utilizan los mismos medios de cultivo y el Agar TCBS.

En el caso de pacientes con cuadro de diarrea aguda se puede sembrar la muestra de heces, hisopado rectal o vómito directamente en agar TCBS. Otra alternativa para pacientes convalecientes o en la búsqueda de portadores es sembrarla en un medio de enriquecimiento como es el caldo peptonado.

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Cabrera H

El enriquecimiento de la muestra se realiza al inocular 0.5 ml ó 1 g de muestra en un tubo que contenga aproximadamente 10 ml de caldo peptonado alcalino.
Incubar el medio de seis a ocho horas a 37□c.

Luego de éste tiempo se toma una asada de la superficie del medio de enriquecimiento o se aplica la muestra directamente en el medio selectivo que es el agar TCBS, se distribuye la muestra haciendo estrías en la superficie del agar, (la superficie de la placa debe estar seca antes de colocar la muestra) y se incuba por 24 horas a 37□c.

Conjuntamente con la investigación de **V. cholerae** se debe buscar la presencia de otros enteropatógenos bacterianos que producen cuadros similares que pueden ser **E.coli** enterotoxigénico **V. parahaemolyticus, Salmonella** entérica serovar **Enteritidis.**

En el agar TCBS las colonias de **V. cholerae** son de color amarillo, redondas, cremosas, ligeramente convexas, de 2 a 4 mm de diámetro, mientras que las de **V. parahaemolyticus** son de color verde azuladas.

Si se observan colonias de color amarillo, éstas deben inocularse en placas o tubos de TSA el inóculo debe ser abundante para obtener un crecimiento a las 6 u 8 horas y poder realizar pruebas presuntivas rápidas: oxidasa, prueba del cordón (String test) y la serología con suero polivalente 01, para obtener un diagnóstico rápido. Al mismo tiempo las colonias sospechosas se deben inocular en TSI, LIA (con un papel filtro impregnado en reactivo Kovac o de Gilles para la prueba de Indol). Estos se incuban a 37□c por 18 a 24 horas.

De no contarse con suero polivalente se puede hacer la prueba de tolerancia a la sal para confirmar la presencia de **V. cholerae.**

PRUEBA DE OXIDASA

Sobre un pedazo de papel filtro en una placa de petri, se colocan 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa. Se extiende el cultivo sobre el papel húmedo utilizando un palillo de dientes (no se debe utilizar el asa de siembra que generalmente es de nicrón pues dan falsos positivos). La coloración violeta oscura que aparece en 30 segundos a 1 minuto indicará un resultado positivo caracteristico de Vibrio. Como control negativo de la prueba se utiliza una cepa de **Escherichiacoli** y como control positivo una cepa de **Pseudomonas aeruginosa.**

PRUEBA DEL CORDON (String test o de la cuerda):

Sobre un portaobjetos se coloca una gota de desoxicolato de sodio al 0.5% y se hace una suspensión con el cultivo en evaluación. La prueba será positiva si la suspensión se vuelve viscosa y se aprecia la formación del cordón al levantar suavemente el asa de siembra. Si sólo se observa turbidez que persiste más de un minuto la prueba es negativa.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

Serología con antisuero polivalente 01:

En una lámina portaobjetos se hace una suspensión del cultivo con una gota de suero fisiológico, frente a ésta se coloca una gota de antisuero polivalente 01 de **Vibrio cholerae**, se mezcla con el asa de siembra e inmediatamente se mueve la lámina en vaivén unas 15 veces para obtener una mezcla óptima; la lectura debe realizarse antes de un minuto y si se observa la presencia de grumos de aglutinación ésta se considera como prueba positiva.

Lectura e interpretación del TSI-LIA: El cultivo de **V. cholerae**, produce en:

- En el TSI: K/A--, se observa el fondo del tubo de color amarillo indicando acidez en el medio (ataque a la glucosa) y la punta del plano inclinado de color rojo, no hay formación de gas a partir de glucosa ni de hidrógeno sulfurado; muchas veces se observa que el plano inclinado es de color amarillo durante las primeras horas de cultivo A/A-- y se va tornando alcalino rápidamente para dar la lectura de K/A--.
- En el LIA:K/K, se observa la decarboxilación de la lisina (fondo y plano inclinado de color morado intenso), indicando la alcalinidad de todo el medio.
- Indol: En el tubo de LIA se observa que el extremo de papel de filtro impregnado con reactivo de Kovac o de Gilles (para la prueba de Indol) toma un color rosado o fucsia indicando un resultado positivo.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

Prueba de tolerancia a la sal.

Se prepara soluciones de caldo peptonado o caldo nutritivo con diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio: 0%, 7% y 10%, se siembra el cultivo a investigarse y se deja 24 horas en la incubadora a 37□c. La lectura se efectúa observando el crecimiento del germen, de acuerdo con el siguiente cuadro:

BACTERIA	

Se pone una gota de cada uno de los antisueros Inaba y Ogawa en una lámina de vidrio, se añade una pequeña cantidad de cultivo al suero con ayuda de un asa de siembra y se mezcla inmediatamente para obtener una suspensión uniforme. Mientras se va rotando la lámina se observa la presencia de aglutinación que debe aparecer antes de los 60 segundos. Sólo una aglutinación franca debe considerarse como positiva. Se debe probar si es que ocurre aglutinación espontánea de la bacteria usando una gota de solución salina fisiológica en lugar del antisuero.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

Antisuerolnaba Ogawa		
Serovar Inaba	+	-
Serovar Ogawa	-	+
Serovar Hikojima	+	+

5. REMISION DE LA CEPA A INVESTIGAR.

Los Laboratorios que realizan cultivos de **V. cholerae** deben remitir al Instituto Nacional Concentración de CINa

	0%	7%	10%
Vibrio cholerae	+	-	-
Vibrio alginolyticus	-	+	+

Determinación de Serotipo

de Salud (**LANARE**), todos los cultivos en agar nutritivo o en TSA en tubos con tapa con rosca o de jebe, o en su defecto en cualquier frasco pequeño de vidrio con tapón sellados con parafina (el cierre debe ser hermético). Debe rotularse el frasco de tal manera que no borre o pierda la identificación, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente, acompañados de su respectiva ficha.

Estos tubos deben transportarse dentro de un recipiente seguro para evitar accidentes, se puede utilizar latas como las de café instantáneo, con las paredes y el fondo acolchado con algodón o papel para que los tubos no se rompan. Estas latas deben estar cerradas herméticamente utilizando para esto tiras de cinta adhesiva alrededor de la tapa. Las mismas deben ir correctamente identificadas por fuera indicando la dirección a donde van a ser enviadas y señalándose que contiene material biológico como se indica a continuación:

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE ENTEROPATOGENOS

Cápac Yupanqui 1400 Jesús María, Lima
Teléfonos 719920, 712529 FAX (5114)-717443
Contiene material biológico
NO REFRIGERAR

6. NORMAS DE BIOSEGURIDAD

El error humano y las prácticas impropias de laboratorio pueden comprometer las mejores medidas de protección, por ello es indispensable que cada laboratorio adopte un código de prácticas apropiadas a su trabajo y que todo el personal lo observe estrictamente.

El personal de laboratorio está expuesto a riesgos profesionales como cualquier otro trabajador. La mayoría de las infecciones adquiridas en el laboratorio pueden atribuirse a uno o varios de los siguientes procedimientos peligrosos comunes a todo el personal de laboratorio:

- Procedimientos que entrañan riesgos de inhalación por ejemplo al sembrar placas de agar, emplear pipetas, centrifugar, homogenizar, flamear asas, abrir cultivos.

- Procedimientos que engendran riesgos de ingestión, por ejemplo el pipetear con la boca, manipulación de muestras, hacer frotis y cultivos.

- Prcedimientos relacionados a la eliminación de material infeccioso.

Son raros los reportes sobre casos de enteritis por **Vibrio cholerae** como consecuencia de una infección en el laboratorio. A pesar que todos los vibrios patógenos pueden encontrarse en las heces, la ingestión de **V. cholerae** constituye el principal peligro.

La dosis oral infectante de **V. cholerae** en individuos sanos no aclorhídricos está en el orden de 10^8 gérmenes.
La importancia de la exposición por aerosoles no es conocida.El riesgo de infección seguida de una exposición oral puede incrementarse en individuos aclorhídricos. Aunque las vacunas han provisto una protección parcial de duración corta (3 a 6 meses) para individuos no inmunes en áreas altamente endémicas, su uso rutinario en el personal de laboratorio no se recomienda.

Todos los procedimientos para el diagnóstico de cólera con cultivos o materiales clínicos infectados potencialmente, deben ser realizados según el Nivel 2 de Bioseguridad. Esto implica las siguientes medidas:

1. El personal de laboratorio debe tener un entrenamiento especifico en el manejo de esta bacteria.

2. No se debe pipetear material infeccioso con la boca (suero sanguíneo, muestras, cultivos).

3. No se permitirá comer, beber, fumar, almacenar alimentos ni aplicarse productos de tocador en el sector de los trabajos de laboratorio.
4. El laboratorio siempre estará ordenado, limpio y libre de todo el material que no sea pertinente a los trabajos.

5. Las mesas de trabajo serán descontaminadas por lo menos una vez al día y después de que caiga sobre ellas cualquier material contaminado.

6. Todas las personas deberán lavarse las manos después de manipular material infeccioso y también al salir del laboratorio.

7. Todos los procedimientos se practicarán cuidadosamente a fin de reducir al mínimo la formación de aerosoles.

8. Se descontaminarán todos los desechos líquidos o sólidos contaminados antes de su eliminación o de darles otro destino.

9. El personal de laboratorio deberá llevar mandiles u otro uniforme apropiado.

V°B° R. RAMOS M.

V°B° A. ROJAS

V°B° JEFATURA E. GALVEZ C.

V°B° A. Cabrera

10. El Jefe del laboratorio garantizará que solamente tengan acceso al laboratorio las personas a quienes se les han advertido los posibles peligros y reúnan los requisitos específicos para entrar en el local.

11. Mientras se llevan a cabo los trabajos, las puertas del laboratorio permanecerán cerradas.

12. No se permitirá la entrada en el laboratorio a las personas expuestas a un mayor riesgo de adquirir una infección o para quienes la infección puede resultar extraordinariamente peligrosa, entre éstas personas figuran los niños y los individuos afectados por inmunodeficiencia o inmunosupresión.

13. Se utilizarán guantes para todos los procedimientos que obliguen al contacto directo con material infeccioso.

14. Cualquier derrame peligroso, accidente o exposición manifiesta o potencial a material infeccioso se notificará de inmediato al Jefe del laboratorio.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

BIBLIOGRAFIA

1. Chapin K, Murray P. Stains. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1674 – 1686

2. Chapin K, Murray P. Media. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1687- 1707

3. Facklam R, Sahm D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 297 – 305

4. Farmer III J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 447- 458

5. Finegold S, Ellen Baron. Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company 1986. USA

6. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JY, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9a ed. Baltimore: Library of Congress Cataloging.in Publicatiion Data; 1994

7. Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios de Salud Publica. *Manual de normas de bioseguridad*. Serie de Normas Técnicas N°18. Lima. 1997

8. Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios de Salud Publica. *Manual de Procedimientos Laboratorios para la obtención y envío de muestra* (I). Serie de Normas Técnicas N°15.Lima. 1997

9. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. Curso Teórico Práctico. En: *Diagnóstico de laboratorio de infecciones respiratorias agudas y enterovirus*. Lima. 1999

10. Isenberg HD. Vol 1: *Clinical Microbiology Procedures handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992

11. Jorgensen J, Turnidge J, and Washington J. Antimicrobial Susceptibility testing: Dilution and disk diffusion methods. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1526 – 1543

12. Kloos W, Bannerman T. *Staphylococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 264 – 282

13. Kiska D, Gilligan P. *Pseudomonas*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 525

14. Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires

MPR-

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Cabero H.