

ÍNDICE

Primer Ciclo: Diagnóstico Directo-----1- 18

Práctica 1: Identificación Macroscópica-----1-5

Práctica 2: Identificación Microscópica-----6 - 9

Práctica 3: Identificación Bioquímica Y Fisiológica.

Antibiograma-----10 - 15

Práctica 4: Interpretación De Los

Resultados-----16 - 17

Segundo Ciclo: Diagnóstico Indirecto-----18 - 24

Práctica 1: Técnicas Del Diagnóstico

Indirecto-----18 -22

Práctica 2: Puesta En Práctica-----23

Práctica 3: Interpretación De Los Resultados---24

Bibliografía-----25

PRIMER CICLO: DIAGNÓSTICO DIRECTO

El **diagnóstico etiológico "directo"** de una enfermedad infecciosa se realiza mediante la visualización del microorganismo en las muestras clínicas o mediante su aislamiento en cultivo y posterior identificación, al re-conocer su anatomía, su fisiología o sus componentes antigénicos o contenido genómico. En la práctica, no siempre es posible el cultivo, bien porque el crecimiento sea enmascarado por el de otros microorganismos, porque el sujeto está recibiendo tratamiento antibiótico o por tratarse de un patógeno de difícil crecimiento o que está en fase no viable. Actualmente existen métodos que permiten asegurar la presencia de un agente sin verlo ni cultivado, pero detectando la presencia de sus componentes, como, por ejemplo, sus antígenos o metabolitos específicos, o bien sus ácidos nucleicos.

En otras ocasiones, podemos confirmar la infección producida por un determinado agente identificando componentes de la respuesta inmune específica. A este tipo de **diagnóstico** le llamamos **"indirecto"**.

PRÁCTICA 1: IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA

TOMA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Para que el trabajo realizado por el microbiólogo clínico sea efectivo, la muestra tomada ha de cumplir una serie de requisitos:

- Se debe tomar antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano, de forma que no esté afectada la viabilidad de los agentes etiológicos, ni se modifique la proporción de microorganismos, ya que si

no, será muy difícil aislar el microorganismo causal, aun cuando el antibiótico administrado no sea el adecuado.

- Tener en cuenta el estadio de la enfermedad: Los resultados del cultivo se han de valorar considerando las manifestaciones clínicas que el enfermo presente y otros parámetros adicionales.
- Colaboración del paciente con el personal sanitario: ya que el paciente ha de obedecer las indicaciones del personal sanitario correctamente para que la toma de la muestra sea adecuada. Por ejemplo, para obtener una muestra de esputo, éste ha de ser profundo, para ello es necesario dar unos golpecitos en la lesión al paciente, así como que inhale aerosoles calientes.
- Cantidad suficiente de la muestra: Se debe obtener el mayor volumen posible de muestra (dentro de los límites razonables), para asegurar los requerimientos adicionales del laboratorio.
- Muestra representativa:
- Muestra acompañada de orientación clínica.
- Transporte de la muestra: Se deben enviar rápidamente al laboratorio, ya que pueden modificarse las características de la muestra. Existen bacterias que son muy lábiles, por lo que si no se transporta rápido la muestra, se muere, por otro lado, el diagnóstico de la infección urinaria es un diagnóstico cuantitativo, y si se tarda mucho tiempo en el transporte de la muestra, las bacterias crecen, por lo que pueden dar lugar a un *falso positivo* en el diagnóstico.
- Guardar los microorganismos en condiciones especiales.
- Rotular adecuadamente.

Otras normas especiales de la toma de la muestra son:

- **MUESTRA DE LÍQUIDO CEGALORRAQUÍDEO:**

Es una muestra muy difícil de tomar, pero es importante debido a que es un líquido estéril, por lo que nos da una información excelente en el caso de hallazgos positivos. Por ese motivo es imprescindible no infectar la muestra al tomarla, ya que puede dar lugar a un falso positivo. Por otro lado, las bacterias que producen meningitis son muy lábiles, por lo que es necesario un transporte rápido de la muestra o conservarla a 37°C.

- **MUESTRA DE ORINA:**

Tiene que cumplir una serie de características:

- Se precisa un lavado previo de los genitales externos
- Ha de ser la primera orina de la mañana
- Ha de despreciarse la primera porción de orina, debido a que contiene bacterias de la uretra
- Mantenerse a 4°C

Como se indicó anteriormente, el diagnóstico de infección urinaria es cuantitativo, considerándose positivo a una concentración superior de 10⁵ bacterias/mililitro, siendo la bacteria causante *E. coli*. Esta bacteria además tiene un tiempo de generación de 20 minutos (tiempo requerido para que una célula se divida dando lugar a dos células, es pues el tiempo que necesita una población para duplicar el nº de células), por lo que si se tarda en hacer la prueba o no se mantiene en las condiciones adecuadas, podremos diagnosticar un falso positivo.

MEDIOS DE CULTIVO

Para poder estudiar los microorganismos en el laboratorio el microbiólogo también debe contar con **medios de cultivo** que posean los nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos. En ellos ha de haber:

- Azúcares: fuente de Carbono.
- Agua: fuente de Hidrógeno y Oxígeno.
- Aminoácidos y proteínas: Fuente de Nitrógeno.
- También es necesaria una fuente de oligoelementos como Sodio, Potasio, Magnesio, Hierro, Manganeseo
- Por otro lado, también se pueden añadir sustancias para aumentar más el crecimiento: extracto de carne, de levadura
- Tampones: necesarios para mantener la osmolalidad, para el crecimiento óptimo del microorganismo.

Según el estado físico, hablamos de medios de cultivo:

- **Líquidos/Caldos de cultivo:** Los nutrientes están en forma de solución acuosa, son más confortables para la bacteria y favorecen la multiplicación (el crecimiento se manifiesta en muchos casos por el desarrollo de turbidez). También es muy útil para distinguir la respiración bacteriana: Las bacterias aerobias se multiplican en la superficie del tubo, las anaerobias lo hacen en el fondo, mientras que las facultativas lo hacen indistintamente. Sin embargo, existe una limitación principal de este medio: Los caldos no nos permiten saber si existe más de una especie, ni si existen muchos o pocos microorganismos, y es que no hay forma de separarlos, por lo que son difíciles de identificar.
- **Sólidos:** Se le añade un gel solidificante como el agar-agar (2–3%). Los microorganismos crecen en placas de Petri en las que está el gel, el cual es un polímero proteico parecido a la gelatina que se obtiene de las algas. En ellos, los microorganismos se manifiestan macroscópicamente como conglomerados o "colonias". Las "colonias" son conjuntos integrados por miles de microorganismos procedentes de una sola célula (una "unidad formadora de colonia", UFC) que quedó implantada en un punto concreto de la superficie del medio. Cada *especie* da lugar a colonias con aspecto morfológico diferente de otras *especies*, lo que nos ayuda a orientar su identificación. La mayoría de las colonias bacterianas son visibles a simple vista en 18 ó 48 horas.

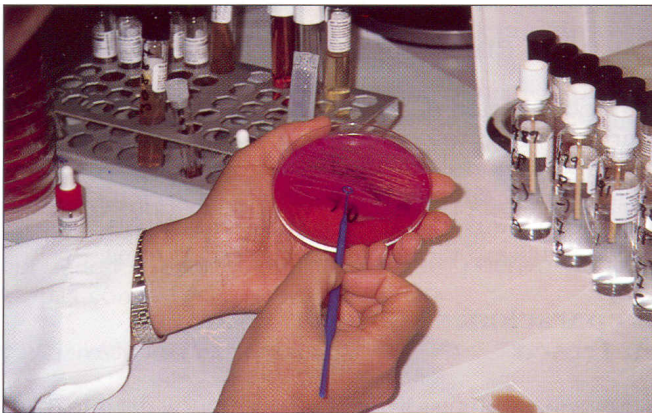


Fig. 1. Aislamiento en placa.

- **Semisólidos/semilíquidos:** Cuando la concentración de agar oscila entre 0'6 –1'5 %. Un ejemplo es aquel en el que existe tioglicolato, que al ser un agente reductor, hay poco Oxígeno en el medio, por lo que es útil para distinguir bacterias aerobias de anaerobias. Además en la superficie del tubo existe un indicador de O₂, la resazurina, de color rosa.

Existe otra clasificación de los medios de cultivo según sea el crecimiento bacteriano:

- **Medios enriquecidos:** Por ejemplo: Agar sangre, al cual se le añade sangre como factor de crecimiento. También puede añadirse suero, y la finalidad es promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.
- **Medios de enriquecimiento:** Se le añade un nutriente que favorece el crecimiento de una bacteria determinada.
- **Medios selectivos:** Se le añaden sustancias químicas (como colorantes o antibióticos a unas determinadas concentraciones) que son capaces de inhibir el crecimiento de una especie determinada.
- **Medios diferenciales:** son medios nutritivos a los que se ha añadido uno o más hidratos de carbono y un indicador de pH. Nos permiten reconocer (por su color) las colonias del microorganismo que queremos aislar, al metabolizar un compuesto concreto en determinada vía metabólica
- Normalmente los medios suelen ser combinados, por ejemplo: Un medio de eosina azul de metileno es un medio selectivo diferencial. Este medio se utiliza para diferenciar las bacterias Gram positivas, a las que inhibe el crecimiento, de las Gram negativas como las enterobacterias (*E. coli*). Este medio contiene lactosa como nutriente, y al ser tomado por las enterobacterias se produce ácido, que hace que el pH del medio baje, por lo que el color del medio pasará a ser violeta oscuro. Si por el contrario las bacterias existentes en el medio no utilizan lactosa, no se produce ácido, por lo que dan lugar a colonias incoloras.

Después de una breve introducción, tomamos una muestra de orina y otra de exudado faríngeo y las sembramos en distintos medios. Normalmente, se suelen sembrar primero en medio líquido, después en un sólido enriquecido y por último en un medio selectivo, aunque todo depende del tipo de muestra:

MUESTRA FARÍNGEA

Se toma de la pared posterior faríngea, así como de las amígdalas. La siembra en los medios de cultivo se realiza con un asa de platino o plástico, asa bacteriológica siguiendo una sistemática estándar.

- Se siembra en un medio líquido con tioglicolato, y para ello sólo se ha de introducir el asa con la muestra previamente tomada en él.
- Se siembra en un medio sólido: agar sangre. Con el asa bacteriológica se hace una estría en la placa y ésta se extiende en zigzag sobre la cuarta parte de la superficie. El asa se flamea para eliminar las bacterias que queden en ella. Se deja enfriar y se efectúa un segundo pase con el asa iniciándolo en la zona que se ha agotado primero y terminando lejos de ella, el proceso se repite otra vez y de este modo logramos obtener colonias aisladas (fig. 1). El objetivo es identificar colonias distintas.

MUESTRA DE ORINA

Al ser un estudio cuantitativo hemos de tener en cuenta el volumen del asa, para poder realizar los cálculos correspondientes. Este volumen es de 10 l.

- Se esteriliza el asa (flameándola)
- Se introduce el asa en orina para tomar la muestra.
- Se introduce en el medio líquido (tioglicolato). (Una muestra de orina nunca se siembra en medio líquido).
- Esterilizar el asa.
- Introducir en orina para la toma de la muestra.

- Sembrar en agar sangre: El método es distinto al realizado para la muestra faríngea debido a que el objetivo también lo es; ahora necesitamos saber el número de bacterias totales para diagnosticar o no infección urinaria. Por este motivo, depositamos la muestra en una cruz central, y después se realizan estrías muy adyacentes unas a otras que ocupen toda la placa y en varios sentidos. Todo esto se realiza sin esterilizar el asa.
- Esterilizar el asa.
- Tomar la muestra.
- Sembrar en eosina azul de metileno. Se hacen estrías en una tercera parte de la placa, se flamea y se toma la muestra de nuevo para volver a hacer estrías en el otro tercio, y volvemos a hacer lo mismo para completar el último tercio.

Una vez inoculados los medios con la muestra problema del enfermo, la mayoría de los microorganismos crecen bien a las 18 ó 24 horas y a una temperatura entre 35–37 °C. Nosotros incubamos ambas muestras a 37°C durante 24 horas.

PRÁCTICA 2: IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

Tras incubar las muestras procedemos a su interpretación:

MUESTRA FARÍNGEA

- Tioglicolato: Vemos muchas bacterias a lo largo del tubo, pero sobretodo en la superficie y menos en el fondo, lo que nos da idea de que hay varios tipos distintos de bacterias. Son de color blanquecino y muy pequeñas, similares a copos de nieve.
- Agar sangre: Vemos muchas colonias y de muy distintos tipos, planas, elevadas, brillantes, opacas. Además hay algunas que son blancas (que suelen ser pequeñas) y otras que tienen un halo oscuro. Éstas últimas emiten una toxina que destruye los hematíes de la sangre. Ésta puede ser:
 - Alfa: el halo es de color verdoso, por lo que los hematíes no se destruyen completamente. Es la que encontramos en la muestra.
 - Beta: Color transparente, se da una hemólisis completa.

MUESTRA DE ORINA

- Tioglicolato: El crecimiento es homogéneo y el líquido se ve turbio. Este es el crecimiento típico de las enterobacterias Gram negativas.
- Agar sangre: Si vemos más de mil colonias es que existe una infección urinaria. Estas colonias son grandes, convexas y de un color grisáceo brillante.
- Eosina azul de metileno: El color es morado, por lo que la bacteria consume lactosa, y las colonias son muy grandes, se elevan mucho en superficie y tienen un color verdoso metálico con centro azulado, por lo que deducimos que son colonias de E. Coli, ya que éste es el principal patógeno urinario. Produce cistitis.

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico, ya que además de poner de manifiesto la morfología del microorganismo (cocos, bacilos...), nos divide a las bacterias en dos grupos:

- Gram-positivos cuando aparecen teñidos de color azul-violeta
- Gram negativos cuando se visualizan de color rojo-rosado.

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el **peptidoglicano**. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

Bacteria Gram Positiva	Bacteria Gram Negativa
------------------------	------------------------

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente: el frotis fijado con calor se tiñe un minuto con el colorante con violeta genciana, se lava con agua, se cubre con solución Yodada durante otro minuto y se lava de nuevo con agua, se decolora con una mezcla de alcohol etílico y acetona y por último se escurre y cubre con Safranina (color de contraste, rojo) durante 20 segundos. Para finalizar, lavar y secar.

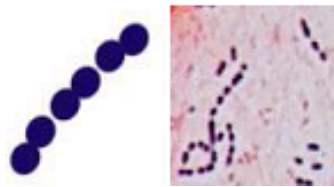
De esta forma, las bacterias gram positivas se tiñen del primer colorante, y al tener una gruesa pared celular, no sufren decoloración alguna, por lo que no se colorean con el segundo colorante y finalmente se ven de color azul-violáceo. Las gram negativas, por otro lado, se tiñen de violeta, pero se decoloran y pierden el color, aceptando más adelante el segundo colorante. Como consecuencia las vemos de color rojo-rosado.

La técnica para realizar una tinción de gram se describe a continuación:

- Se elige una colonia aislada
- **Suspensión** de la colonia: Se pone una gota de agua lo más pequeña posible en un portaobjetos (nos servimos para ello de una pipeta)
- **Extensión**: Con el asa bacteriológica con la colonia extendemos la gota de agua.
- **Fijación**: Una vez secado el porta, se pasa por la llama, así las proteínas bacterianas se adhieren al vidrio.
- **Coloración**: Con violeta de genciana durante un minuto.
- **Lavado**: Utilizamos para ello el frasco lavador
- **Fijación** de la muestra con lugol.
- **Decoloración**: con alcohol durante quince segundos.
- **Lavado**.
- **Coloración** con el segundo colorante: Safranina durante un minuto.
- **Lavar**
- **Secar**
- **Observar** con el microscopio de inmersión

Al realizar la tinción a las distintas muestras llegamos a la siguiente conclusión: La muestra de faringe son cocos gram positivos, mientras que la de orina son bacilos gram negativos.





TINCIÓN DE ZIEHL–NIELSEN

Se utiliza para el diagnóstico de la tuberculosis, producida por *Mycobacterium tuberculosis*, difícil de teñir debido a que posee grandes cantidades de lípido en su superficie. Además, es ácido alcohol resistente, por lo que una vez que se tiñe no pierde la coloración. A continuación se muestra un breve resumen de la técnica a seguir.

- **Obtención** de una muestra de esputo.
- **Tinción.** El primer colorante es la fuccina (color rojo intenso). Se tiñe la muestra del colorante y se calienta hasta que empiece a hervir. Se deja enfriar y se repite el ciclo varias veces más.
- **Decoloración:** Se utiliza un decolorante muy potente: etanol con clorhídico.
- **Tinción** con el segundo colorante: Azul de metileno.

Así, una vez realizada la tinción todas las bacterias se verán de color azul, menos los bacilos de la tuberculosis que son rojos.

PRÁCTICA 3: IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA. ANTIBIOGRAMA.

Realizamos distintas pruebas a ambas muestras para concluir en la identificación de los microorganismos.

MUESTRA FARÍNGEA

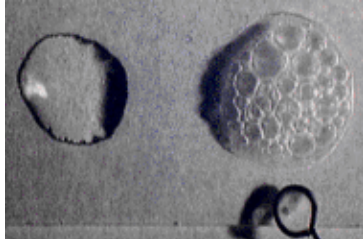
Al ser bacterias gram positivas a esta muestra le realizaremos las siguientes pruebas:

- **Prueba de la OPTOQUINA:** Se utiliza para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* (sensibles) de otras especies de estreptococos alfa hemolíticos. El método a seguir es el siguiente:
 - Se toma una colonia con es asa bacteriológica.
 - Se siembra en una placa nueva de agar sangre: Con el asa, se realiza una estría hasta aproximadamente la mitad de la placa, y después se siembra en zig-zag muy adyacente también hasta la mitad de la placa.
 - Se coge un disco de optoquina y se pone en el centro de la estría.
 - Se incuba durante 24 horas a 35°C.
 - **Interpretación:** Si la bacteria fuese *S. Pneumoniae*, no crecería con otoquina, por lo que se produciría un halo de inhibición alrededor del disco. En el resto de la placa la bacteria crecerá normalmente.
- **Prueba de la COAGULASA:** Esta prueba se utiliza para diferenciar al *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de otras especies del género *Staphylococcus*. La coagulasa es una enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima. Si es coagulasa positivo, se produce una turbidez alrededor de la colonia, debida a la coagulación del plasma. Por otro lado, realizamos esta prueba cultivando a las bacterias en un medio rico en manitol (además de plasma). El manitol es un azúcar y gracias a este medio podremos distinguir si el microorganismo lo utiliza como fuente de carbono. Si es capaz de usarlo, se produce una acidificación del medio, lo que da lugar a un viraje del indicador de pH de rojo a amarillo.

- **Prueba de la CATALASA:** Es la prueba definitiva para distinguir el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del *Streptococcus* (catalasa negativo). La catalasa es una enzima capaz de destruir el agua oxigenada generada en algunos procesos metabólicos. Esta enzima está presente en la mayoría de las bacterias que contienen citocromos, bien aerobias o anaerobias facultativas.



Esta reacción produce un burbujeo característico, el cual nos sirve para identificar si el microorganismo contiene la enzima.

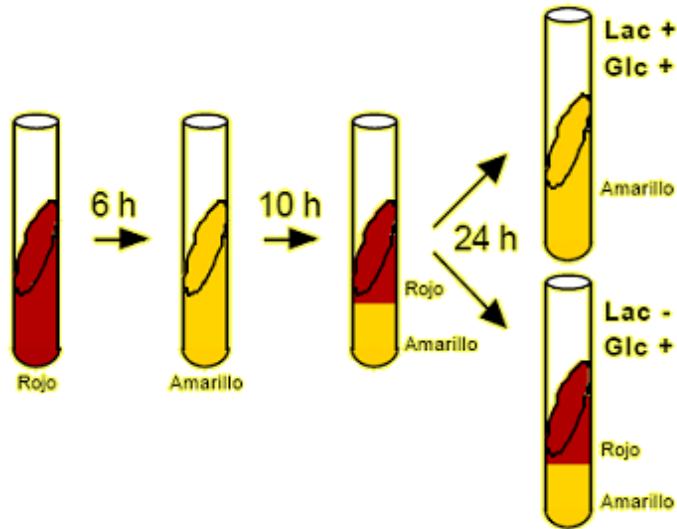


Sin embargo, esta prueba debe realizarse en un medio sin sangre, ya que en ella también se produce burbujeo con H_2O_2 .

MUESTRA DE ORINA

Como bien se dijo anteriormente las bacterias de esta muestra son gram negativas, y debido a esto, las pruebas que realizaremos son las siguientes:

- **TSI:** proporciona varios datos fisiológicos importantes para determinar si un microorganismo es: fermentador de glucosa, fermentador de lactosa, productor de gas, productor de ácido sulfhídrico. Además es un medio que requiere un procedimiento de inoculación especial. En él se obtiene la siguiente información fisiológica.
- **Fermentación de glucosa y lactosa.** El medio contiene una pequeña cantidad de glucosa y una gran cantidad de lactosa. Los microorganismos capaces de fermentar cualquiera de estos compuestos darán lugar a la formación de ácidos que bajan el pH del medio. Como este medio contiene rojo fenol, éste vira a amarillo (está rojo a pH neutro, fucsia a pH básico y amarillo a pH ácido). La sucesión de eventos metabólicos es la siguiente (ver dibujo):
 - El microorganismo utiliza la fuente de carbono más asequible en el medio, la **glucosa**. Pero como se encuentra en el medio en muy baja concentración se agota rápidamente. Los productos de su degradación acidifican el medio que cambia de rojo a amarillo.
 - Al agotarse la glucosa empieza a utilizar las peptonas, pero solamente en aerobiosis (se corresponde a la zona del pico de flauta del tubo). Este consumo da lugar a residuos amoniacales, produciendo una basificación del medio. El indicador vira a rojo en esta parte del tubo.
 - Posteriormente se produce el consumo de **lactosa**, en el caso de los microorganismos que sean capaces de utilizar este disacárido. Esto da lugar a un descenso de pH por lo que cambiará el medio de rojo a amarillo. La razón de que la lactosa se utilice después es debido al tipo de regulación de la **βgalactosidasa**, que es la enzima que hidroliza este disacárido para dar los correspondientes monosacáridos. Se trata de una enzima inducible, lo que significa que existe un periodo de latencia entre el agotamiento de la glucosa y la producción de las primeras moléculas de βgalactosidasa, de tal forma que después de un tiempo de consumo de peptonas se comienza a utilizar lactosa.



- **Producción de gas.** La producción de gas se detecta por la formación en el medio de burbujas de gas perfectamente visibles ya que cuartean el medio. El gas se origina mediante la reacción catalizada por la **formiato liasa** a partir de ácido fórmico.



Por tanto, son gas (+) aquellos microorganismos que produzcan esta enzima y serán detectados debido a que el medio aparece fragmentado.

- **Producción de SH₂.** El ácido sulfhídrico se detecta porque reacciona con las sales de metales pesados (Fe²⁺) presentes en el medio. Esto da lugar a la formación de **sulfuro de hierro** que se deposita en gran parte del tubo, sobre todo en el fondo, oscureciendo el medio.

Procedimiento:



- **Inocular** los microorganismos aislados en un tubo de medio TSI con el asa de siembra. La siembra se hará de la siguiente manera: sembrar la superficie por estría y sembrar la parte interna del medio por picadura (es necesario pinchar suficientemente, sobre todo para la detección de producción de sulfhídrico).
- **Incubar** 24 horas a 37°C.
- **Prueba de la UREASA:** Se realiza para distinguir los microorganismos que contienen la enzima ureasa. Esta enzima sirve para que la bacteria pueda utilizar la urea como fuente de nutrientes, liberando al medio radicales amonio. Así, utilizamos un medio rico en urea (en tubo) y con un indicador de pH (rojo fenol). Sembramos en superficie en el pico de flauta e incubamos. Si la bacteria

tiene la enzima, al liberar radicales amonio se producirá una gasificación del medio, por lo que éste virará a fucsia.

ANTIBIOGRAMA

El **antibiograma** se utiliza para comprobar cuál de una serie de antibióticos es más activo frente a un determinado microorganismo, es decir se estudia la sensibilidad y resistencia de las bacterias a los antibióticos. Se suele definir a un microorganismo como sensible cuando se inhibe su crecimiento (agentes bacteriostáticos) ó se produce la muerte celular (agentes bactericidas), y por el contrario será resistente cuando no se produzca esto. Para indicar la sensibilidad o resistencia utilizamos dos variables:

- CMI: Concentración mínima inhibitoria: Menor concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriológico. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.
- CMB: concentración mínima bactericida: Menor concentración de antibiótico que destruye a las bacterias.
- Normalmente la CMI es menor que la CMB y ambas se miden en mg/l.

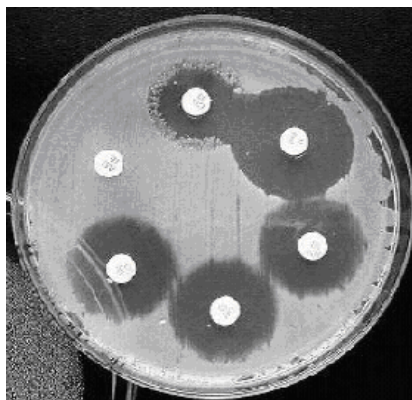
Sin embargo, la sensibilidad o resistencia del microorganismo al fármaco también depende de la farmacocinética de éste y de la localización del microorganismo.

Para entender mejor estos conceptos, ponemos el ejemplo de *E. Coli*, siendo el antibiótico utilizado gentamicina.

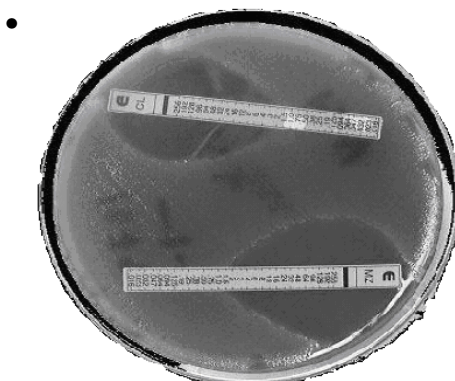
- La CMI para *E. Coli* es 1 mg/l
- *E. Coli* es uno de los principales agentes de infección urinaria, cistitis... Según la farmacocinética, la gentamicina alcanza en orina una concentración de 100 mg/l, por lo que se inhibiría el crecimiento de la bacteria.
- En el SNC *E. Coli* produce meningitis, y la concentración del fármaco en este lugar es de 0'1 mg/l, por lo que en este caso, la bacteria sería resistente al antibiótico.
- Según esto, podemos concluir que la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico depende del lugar donde se encuentre ese microorganismo y de las concentraciones del fármaco en ese lugar. Así, si la concentración del fármaco es mayor que la CMI de la bacteria a ese antibiótico, ésta será sensible.

MÉTODOS DE ANTIBIOGRAMA

- DIFUSIÓN: Es el más importante, de mayor sencillez y menor coste pero no permiten cuantificar la CMI ni CMB, aunque su eficiencia clínica es elevada. Podemos realizar este método en distintos medios y de distintas formas.
 - ♦ Agar Mueller Hinton: Una vez sembrada la placa, colocamos una serie de discos de papel de filtro impregnados en distintas concentraciones del antibiótico a estudiar. Se incuba durante 24 horas a unos 35°C. De esta forma, el antibiótico difunde, y si la bacteria es sensible, alrededor del disco habrá un halo de inhibición del crecimiento. Se relaciona diámetro del halo con sensibilidad o resistencia.



En esta imagen se muestra una vista general de una placa con crecimiento bacteriano y con seis discos de antibióticos. La zona de color claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento en las zonas no inhibidas. Los círculos negros que rodean a cinco de los seis discos marcan las zonas en que los respectivos antibióticos han inhibido, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo a estudio. El sexto disco no tiene a su alrededor halo de inhibición lo que indica la resistencia del microorganismo a ese antibiótico.



Epsilon test: Es uno de los métodos más recientes que se han presentado en el mercado. Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CMI en $\mu\text{g/ml}$, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico indicadas en una escala graduada sobre la propia tira. El microorganismo a investigar se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico (o antibióticos) a ensayar. Tras la incubación, se observan las placas y se valora la zona de inhibición, de forma elíptica, alrededor de cada tira. La CMI se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente crecimiento.

En la fotografía de la izquierda se muestra una vista general de una placa con crecimiento bacteriano y con dos tiras de E-test. La zona de color más claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano en las zonas no inhibidas. Las elipses más oscuras que rodean la parte superior de las tiras E-test marcan las zonas en que los respectivos antibióticos han inhibido, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo a estudio.

• DILUCIÓN:

- Dilución en caldo, base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller–Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio. Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (usualmente de un día para el otro) se observa la turbidez de los tubos que indicará

desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo (CMB) se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad. Tomamos muestras de los tubos situados desde la CMI hacia arriba y las sembramos. La CMB será la concentración mínima de antibiótico que destruya el 99% de las colonias.

- **Dilución en agar:** Se hace de la misma forma pero en placas de medio sólido y el antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. La ventaja es que para inocular existe un instrumento que es como un peine con púas metálicas y en cada una de ellas se colocan bacterias distintas, que se depositan en la placa. De esta forma con una sola placa se inoculan muchas bacterias.
- **MÉTODOS AUTOMATIZADOS:** La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo. Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.

PRÁCTICA 4: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de las distintas pruebas realizadas a las muestras fueron:

MUESTRA FARÍNGEA

- **Prueba de la OPTOQUINA:** No observamos inhibición, por lo que el microorganismo no es un *Streptococcus pneumoniae*.
- **Prueba de la COAGULASA:** Aparece un color amarillento alrededor de las colonias, por lo que las bacterias utilizan el manitol como fuente de carbono. También se produce turbidez, por lo que además es coagulasa positivo.
- **Prueba de la CATALASA:** Aparecen burbujas en el medio.
- Por estos motivos deducimos que las colonias de la muestra faríngea pertenecen al género *Staphylococcus* (catalasa positivo) y dentro de éste a la especie *S. Aureus* (coagulasa positivo).

MUESTRA DE ORINA

- **TSI:** Tanto el pico de flauta como el cuerpo del tubo aparecen en color amarillo, por lo que las bacterias son glucosa y lactosa positivas. Además, el agar aparece fragmentado, lo que indica que también son gas positivas. Sin embargo, no aparece turbidez en el fondo del tubo, de forma que las bacterias no producen SH₂.
- **Prueba de la UREASA:** El color del medio no cambia; las bacterias no contienen la enzima ureasa.

- Debido a esos resultados, podemos decir que la bacteria inoculada era una *Escherichia coli* (lactosa y glucosa (+), gas(+), SH₂ (-) y ureasa (-).

SEGUNDO CICLO: DIAGNÓSTICO INDIRECTO

El organismo dispone de un sistema de defensa inespecífico que le permite defenderse de los agentes externos en ausencia de contacto previo, y de un sistema de defensa específico, más desarrollado y sofisticado, que le permite defenderse con eficacia frente a microorganismos y que exige para su desarrollo un reconocimiento previo del agente. Este mecanismo puede adquirirse por contacto con el agente o sus antígenos a través de una infección, por inoculación voluntaria (vacunación) o por administración de anticuerpos preformados en otro organismo (anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta). Esta respuesta específica, además es capaz de producir una memoria, un recuerdo del contacto con el antígeno que le permitirá reaccionar de forma más eficaz en el siguiente contacto.

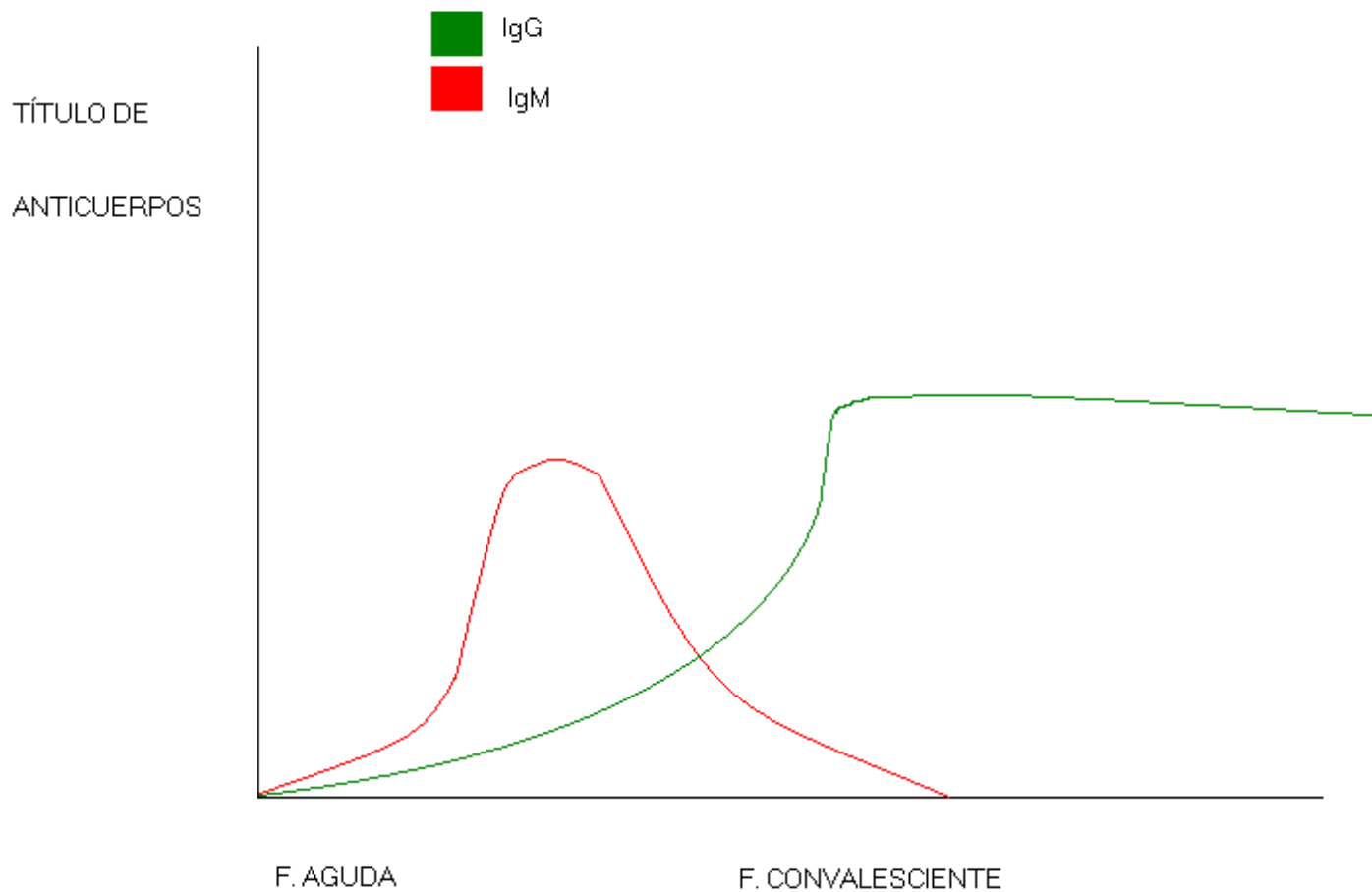
El hecho de que el organismo disponga de una respuesta inmune específica no sólo permitirá defenderse de esos agentes, sino también conocer en muchos casos la presencia de una enfermedad infecciosa; esa es la base del diagnóstico microbiológico indirecto. La denominación de indirecto se refiere a que no se hace por aislamiento o identificación del microorganismo causante de la infección, sino a través de la respuesta del huésped.

PRÁCTICA 1: TÉCNICAS DEL DIAGNÓSTICO INDIRECTO

EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Cuando un individuo se pone en contacto con un antígeno por primera vez, ocurren los siguientes fenómenos que se relacionan con el diagnóstico serológico: (ver gráfica)

- Aparición precoz de un anticuerpo específico de clase IgM. Su concentración no es muy alta y su persistencia es generalmente corta.
- Fase de convalecencia: Aparición algo más tardía de un anticuerpo específico de la clase IgG. La concentración de este anticuerpo va creciendo hasta alcanzar en 3–6 semanas, una meseta que muy lentamente desciende. Su persistencia suele ser muy prolongada, mucho más allá de la curación del enfermo y en ocasiones es detectable durante toda su vida.



Tomando como base los fundamentos citados, se toma una muestra de sangre al enfermo a diagnosticar, en ella podremos detectar la concentración de IgG. Como ésta se mantiene durante mucho tiempo, para saber si se está produciendo en un momento determinado, se toman dos muestras de sangre distanciadas en el tiempo (una de la fase aguda y otra de la convalescente). En ambas se mide la concentración de IgG y si ésta es mayor en la segunda muestra significa el sistema inmunológico está produciendo anticuerpos frente al antígeno determinado. Este incremento en la concentración de anticuerpos específicos cuando comparamos dos muestras de suero de un paciente, recibe el nombre de **seroconversión**. Una vez que existe seroconversión, puede que nos interese conocer la concentración de anticuerpos que tiene el paciente, para ello se va diluyendo su suero en base 2. Estudiamos los distintos sueros hasta llegar al que la reacción inmune no da positiva. El anterior, será la máxima dilución en la que la reacción da positiva. A mayor dilución máxima, mayor proporciones tendrás la reacción.

La utilidad de los estudios serológicos no sólo se limita al diagnóstico, sino también a estudios epidemiológicos: La demostración del estado inmunitario de una población puede hacerse fácilmente mediante la seroconversión. El estudio retrospectivo de los anticuerpos presentes nos indicará la prevalencia de este microorganismo en dicha población, y, dependiendo de su distribución, se indicaría la conveniencia de establecer campañas de vacunación.

Por otro lado, existen una serie de técnicas basadas en la especificidad antígeno-anticuerpo, es decir, la reacción del antígeno (Ag.) con el anticuerpo (Ac.) para formar complejos Ag.-Ac. Ésta se realiza en una zona pequeña en la que se complementan el determinante antigénico y la zona combinante del anticuerpo. Es una reacción físico química específica, reversible, que ocurre in vivo (en el ser humano) e in vitro (en el laboratorio). Los factores que hacen posible esta unión son:

1º. La complementariedad de las regiones que intervienen en la reacción. Hace que ambas regiones estén muy próximas.

2º. Las fuerzas de atracción: iónicas por la carga diferente de los reactivos, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Estas fuerzas se potencian por la proximidad de las regiones que intervienen en la reacción.

- **TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN:** En tubo o placas con pocillos: Sirve con antígenos grandes. Se añaden anticuerpos aglutinantes específicos para determinados antígenos y si ambos se encuentran se produce la reacción de aglutinación. Si la reacción es positiva, ambas partículas quedan unidas formando un retículo, se forma una especie de alfombra, de malla. Si por el contrario es negativa, los antígenos caen por su propio peso al fondo del pocillo. También se puede ir diluyendo el suero problema en base 2, y se añaden cantidades iguales y conocidas de antígeno. El último pocillo en el que se observa reacción de aglutinación, nos indica la máxima dilución en la que la reacción da positiva.
- **TÉCNICA DE HEMAGLUTINACIÓN:** También llamada microaglutinación. Se usan los hematíes como soporte de antígenos pequeños. El fundamento es el mismo.
- **FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO:** Buscamos anticuerpos fijadores de complemento. El procedimiento es el siguiente:

- Se calienta el suero a 57°C durante 20 minutos. De esta forma se destruye el complemento.
- Añadimos el complemento en las cantidades determinadas.
- Ponemos el suero en contacto con el antígeno a estudiar.
- Si en el suero existen anticuerpos fijadores de complemento específicos para el antígeno, se produce la reacción Ag-Ac que activa al complemento, por lo que éste se consume.
- En una segunda fase, ponemos en el suero hematíes y además anticuerpos fijadores de complemento para esos hematíes: Anticuerpo antihematíes.
- Si ha sido fijado el complemento por haberse formado el inmunocomplejo, éste ya no se encuentra a disposición del complejo hematíes-Ac antihematíes, por lo que no se origina hemólisis y la reacción es pues, positiva. (se ve como un botón al fondo del pocillo)
- Si por el contrario no hubo unión Ag-Ac en la primera fase, en la segunda hay complemento para que pueda ser consumido por el complejo hematíes-Ac antihematíes, lo que origina hemólisis.

- **INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA:** Fases:

- Ponemos Ag en un portaobjetos.
- Colocamos una gota de suero encima. (Si existe anticuerpo, se unirán)
- En una segunda fase utilizamos una antigammaglobulina humana (Ac dirigido contra las gammaglobulinas humanas), previamente marcada con una sustancia fluorescente.
- La reacción es positiva si la antigammaglobulina se une al complejo Ag-Ac, y se manifiesta la fluorescencia. Para ello utilizamos el microscopio de fluorescencia.
- La reacción es negativa si la antigammaglobulina no se une debido a que no existe anticuerpo, por lo que no se distinguirá fluorescencia.
- Esta reacción también se hace dividiendo el suero en base 2, como hemos explicado anteriormente.
- **TÉCNICA DE ELISA:** Es una técnica poco específica, por lo que puede dar falsos positivos, pero se realiza para hacer más adelante otra prueba confirmatoria. En este caso, la antigammaglobulina está marcada con una enzima que produce un cambio de coloración. Así si existe reacción Ag-Ac la antigammaglobulina se une a ellos, produciendo un cambio de color. Además, se relaciona la intensidad del cambio de coloración con la cantidad de anticuerpo que tiene el paciente.

- **WESTERN-BLOT:** Se usa sobretodo para diagnosticar hepatitis B y SIDA. Para éste último se hace primero una ELISA y si da positivo, procedemos a realizar esta prueba. Técnica:
 - Se hace una electroforesis de las proteínas del VIH en gel de poliacrilamida, separándose según su peso molecular.
 - Transferimos estas proteínas a una membrana de nitrocelulosa, generalmente se transportan por capilaridad.
 - Se corta la membrana a tiras.
 - Incubamos las tiras con el suero del enfermo.
 - Si existen anticuerpos contra el VIH, éstos se unirán en distintas partes de las citadas tiras. Hay una serie de ellas que son claves para diagnosticar un caso de VIH positivo.
- **ROSA DE BENGALA:** Es una técnica especializada en el diagnóstico de la brucelosis (enfermedad producida por el género *brucella*). Se utiliza como antígeno una suspensión bacteriana a la que se ha añadido el colorante rosa de bengala, enfrentándola al suero sin diluir del enfermo. Proporciona una aproximación diagnóstica en pocos minutos con una sensibilidad y especificidad muy altas.

PRÁCTICA 2: PUESTA EN PRÁCTICA

Caso práctico: Varón de 35 años. Acude a consulta diciendo padecer fiebre no elevada, sudoración nocturna, cansancio general, algias...

- Realizamos la prueba del rosa de bengala, ante las sospechas de que el paciente sufra de brucelosis. El colorante lleva ya brucelas añadidas. Para llevar a cabo este método, utilizaremos además un suero que de positivo (control positivo), que compararemos con el suero problema. En ambos ponemos 50*1 del agregado colorante-bacteria, mezclamos, agitamos y esperamos. Para dar positivo ha de producirse un granulado antes de 4 minutos. En este caso dio negativo, pero habría de hacerse una prueba confirmatoria. Si hubiera dado positivo, se pone al enfermo en tratamiento y en dos o tres semanas se toma otra muestra del suero. Se realiza el diagnóstico serológico.
- **Microaglutinación:** tenemos suero problema previamente diluido en 1/10. Realizamos esta prueba en una serie de pocillos divididos por filas.
 - ◆ En la primera fila pondremos el control positivo.
 - ◆ En la segunda en control negativo.
 - ◆ En la tercera, muestra de suero de la fase aguda.
 - ◆ Y por último, muestra del suero problema en la fase de convalecencia.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- Añadir 50*1 de solución salina en todos los pocillos, menos en el primero de cada fila.
- En la fila de control positivo, añadimos 50*1 de éste en el primer pocillo y en el segundo. Mezclando el contenido de este pocillo, cogemos 50*1 de él, para ponerlo en el tercer pocillo. Así se va diluyendo el suero hasta el final de la fila, menos en el último pocillo. (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160...)
- En la fila de control negativo realizamos el mismo procedimiento, así como en las de suero.
- Por último se añaden 50*1 de antígeno en TODOS los pocillos. El último pocillo nos sirve de control de Ag.
 - **Reacción positiva:** Se observa una malla al fondo del pocillo.
 - **Reacción negativa:** Los antígenos precipitan.
 - El último pocillo que de positivo, nos indica el título de anticuerpos.

PRÁCTICA 3: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- ◆ En la fila de control positivo, da positivo hasta el octavo pocillo: es decir, el pocillo cuya

dilución es 1/2560.

- ◆ En el control negativo, todos los pocillos dan negativos.
- ◆ En la fila del suero de la fase aguda, el segundo pocillo es el último en el que la reacción da positiva (1/20).
- ◆ En la del suero de la fase convaleciente, el último pocillo positivo es el noveno (1/5120).
- ◆ Como la dilución máxima es mayor en el suero de la fase de convalecencia que en el de la fase aguda, decimos que se da seroconversión, por lo que el enfermo sufre de brucelosis.

BIBLIOGRAFÍA:

- ◆ Microbiología Médica. J.A. García Rodríguez, J.J Picazo. Harcourt Brace 1998.
- ◆ Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. E.J. Perea. Doyma 1992.
- ◆ Internet