

UT.2 BACTERIOLOGÍA

2.1 SECCIÓN 1: ESPIROQUETAS

ORDEN I: SPIROCHAETALES

FAMILIA I: SPIROCHAETACEAE

GÉNEROS:

- SPIROCHOETA
- CRISTISPIRA
- TREPONEMA
- BORRELIA

FAMILIA II: LEPTOSPIRACEAE

GÉNERO I: LEPTOSPIRA

INTRODUCCIÓN

Las espiroquetas son m.o que se pueden encontrar en múltiples ambientes. Están presentes en aguas contaminadas y residuales, en el suelo, en materia orgánica en descomposición y también, en el cuerpo humano y animales.

Estas bacterias tienen una forma espiral típica y son de una gran movilidad. Utilizan para moverse dos o más filamentos axiales que se encuentran localizados entre la pared celular y la membrana externa. Un extremo de cada filamento axial se fija cerca del extremo de la célula, lo que le permite movimientos de rotación y de flexión. Este mecanismo de movimiento está especialmente adaptado para moverse a través de líquidos que son demasiado viscosos como para permitir la movilidad por flagelos.

Pueden ser aerobias, anaerobias facultativas o anaerobias. No poseen ni flagelos ni forman esporas.

FAMILIA I/ GÉNERO III: TREPONEMA

El género Treponema comprende tanto especies patógenas, que afectan al hombre, como otras saprofitas, que forman parte de la flora del tracto intestinal, de la boca y del tracto genital.

Entre los patógenos tiene especial importancia Treponema pallidum, que es el agente causal de la Sífilis. Los T. Patógenos son bacterias Gram-, microaerofílicos, que producen infecciones crónicas de larga duración en aquellas personas que no han recibido tratamiento.

Los T. No patógenos se caracterizan por ser más anchos y más cortos, forman parte de la flora normal del hombre y animales y, a diferencia de los patógenos, pueden cultivarse en condiciones anaerobias.

TREPONEMA PALLIDUM

Es un m.o que penetra a través de las mucosas intactas, dando lugar a la formación del Chancro Sifilítico tras

un período de incubación de aproximadamente 3 semanas. Suele estar localizado en los genitales externos, aunque también puede localizarse en el cervix, en la boca y en la zona perianal. Esta primera manifestación se denomina **Sífilis Primaria**.

Posteriormente pasa al torrente sanguíneo, a los linfáticos o a ambos y se disemina por todo el organismo. Esta diseminación constituiría la **Sífilis Secundaria** que se manifiesta particularmente por afectaciones mucocutáneas.

A continuación viene un **Período de Latencia**, tras el cual pueden aparecer recurrencias.

Aproximadamente en un tercio de los pacientes no tratados se puede producir la **Sífilis Terciaria ó Tardía** que afecta principalmente a grandes vasos y al Sistema Nervioso Central (SNC).

La Transmisión sexual es la forma más frecuente, aunque también se puede transmitir por vía transplacentaria, lo que produce la Sífilis Congénita.

Diagnóstico de Laboratorio

- Observación Directa ! Microscopía de campo oscuro

La observación directa se realiza en las fases precoces de la enfermedad, siempre y cuando la observación se realice inmediatamente después de haber tomado la muestra, ya que los Treponemas son muy sensibles a las condiciones ambientales.

- Pruebas Serológicas:
 - ◆ Utilizando Ag NO treponémicos: cuando se utilizan las pruebas no treponémicas los Ac se detectan 1 ó 2 semanas después de la aparición del Chancro. Los títulos van aumentando progresivamente durante la etapa secundaria y, después de esa etapa, comienzan a disminuir. La respuesta al tratamiento se traduce en una disminución del título que, en caso de curación pueden hacerse negativos en un período de entre 6 y 18 meses. El problema que tienen estas pruebas es que no son específicas, por lo que pueden darse falsos positivos. Por eso, cualquier prueba no treponémica que de un resultado positivo siempre debe confirmarse con una prueba treponémica.

Por el contrario, las pruebas treponémicas no sirven para el control de la enfermedad ni para evaluar la respuesta al tratamiento. Estas pruebas treponémicas permanecen positivas durante muchos años, incluso después de la curación de la enfermedad.

Las pruebas no treponémicas más habituales que se utilizan para el serodiagnóstico de la Sífilis son la VDRL y la RPR. Ambas pruebas son inespecíficas en el sentido de que no detectan Ac contra la espiroqueta, sino que detectan Ac reagínicos. Estos Ac reagínicos son, aparentemente, una respuesta contra sustancias lipídicas que se forman en el organismo como consecuencia directa de la infección por Treponema.

El Ag que se utiliza en estas pruebas no son Treponemas, sino que es un extracto de corazón de buey que se denomina Cardiolipina. Este extracto contiene lípidos similares a los que estimulan la producción de Ac reagínicos.

- Utilizando pruebas treponémicas: Se detectan Ac treponémicos. Son pruebas específicas.

Las más utilizadas (tanto treponémicas como no treponémicas) en el laboratorio para el diagnóstico de Sífilis con la RPR y la FTA–ABS.

- ◆ **TPI ó Test de Nelson:** consiste en la inmovilización treponémica
- ◆ **FTA–ABS: inmunofluorescencia indirecta.** En esta prueba se debe absorber primero el suero del paciente con un extracto de Treponema no patógeno para eliminar los Treponemas saprofitos. Una vez realizada la absorción se utilizan Ac marcadores con una sustancia fluorescente.
- ◆ **MHA: hemaglutinación pasiva.** Se trata de una Microhemaglutinación, basada en la aglutinación de hematíes de carnero sensibilizados por Ag treponémicos. La ventaja de esta prueba es que no necesita un microscopio de fluorescencia.
- ◆ **ELISA: detección de IgM e IgG**

FAMILIA I/ GÉNERO IV: BORRELIA

Presenta la morfología característica de las espiroquetas. Tiene afinidad por los colorantes ácidos y, en muestras de tejidos, se pueden poner de manifiesto mediante tinciones argénticas.

Son microaerofílicas y requieren ácidos grasos para su crecimiento. Todas las Borrelias son transmitidas por artrópodos y, algunas son patógenas para el hombre, roedores, aves y animales domésticos.

Las dos especies de mayor importancia para el hombre son:

Borrelia recurrentis: causa la Fiebre Recurrente, transmitida por el piojo humano y cuyo reservorio es el hombre. Para que se transmita requiere que el piojo sea aplastado cuando la persona siente la picadura y se rasca.

La fiebre Recurrente se manifiesta como una enfermedad septicémica, febril, de inicio repentino tras un período de incubación que oscila de 3 a 5 días. La fiebre persiste entre 3–7 días para continuar con un período afebril de varios días o semanas, pudiendo repetirse las recaídas (recaídas) en pacientes que no reciben tratamiento. Estas recaídas se producen por las variaciones antigénicas en el m.o.

Borrelia burgdorferi: es el agente etiológico de la Enfermedad de Lyme que se transmite por garrapatas.

La Enfermedad de Lyme se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria que en su inicio se manifiesta como un exantema que se va extendiendo hasta alcanzar unos 15 cm de diámetro aproximadamente. Se acompaña de mialgias, fiebre y adenopatías. Semanas o meses más tarde después de esta primera manifestación pueden producirse complicaciones, entre las que destacan meningoencefalitis, miocarditis y artritis, principalmente de rodilla.

Diagnóstico de Laboratorio

- Examen Directo:
 - ◆ Detección del artrópodo
 - ◆ Inoculación en animales
 - ◆ Cultivo de Borrelias

El examen directo es válido para la Fiebre Recurrente mientras que las Borrelias que producen la Enfermedad de Lyme solamente se pueden observar mediante tinciones de plata y siempre que la muestra proceda de tejidos.

◊ Técnicas serológicas.

La serología tiene poca aplicación en la Fiebre Recurrente por la variabilidad antigénica que tienen estos m.o. Los métodos serológicos más utilizados son la IFI y métodos de ELISA.

Inconvenientes de las Técnicas Serológicas en la Enfermedad de Lyme:

- ◆ Tiene una respuesta inmunitaria por parte de los individuos variable. Esta variabilidad depende de la presencia de Ac que a su vez depende del estadio en el que se encuentre la enfermedad:

1ª Fase <50% de casos positivos

2ª Fase 70–90% de casos positivos

- ◆ Falta de estandarización y validación de técnicas y Ag utilizados. Existen diferentes procedimientos para realizar estas pruebas por lo que los resultados no se pueden comparar.
- ◆ Sensibilidad y Especificidad de la serología por IFI y ELISA:

40–80% en el primer estadio

75–85% en el resto

- ◆ Existencia de casos negativos en todos los estadios
- ◆ Falsos positivos

(Son más fiables las técnicas de hibridación de DNA como la PCR)

FAMILIA II/ GÉNERO I: LEPTOSPIRA

Comprende patógenos del hombre y de animales, y se les agrupa en dos especies que engloban las Leptospiras patógenas y saprofitas.

Son m.o aerobios, con forma espiral. La mayor parte cultivables en medios que contengan un 10% de suero de conejo y ácidos grasos. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y el tiempo para que se desarrollen las colonias puede oscilar desde 4 días hasta 1 mes.

El reservorio natural de las Leptospiras son los roedores. Una vez que las Leptospiras penetran en el organismo, se fijan en el riñón, secretándose en la orina.

Las enfermedades producidas por Leptospira varían en intensidad y persistencia dependiendo del serotipo y del huésped infectado. Las infecciones por Leptospira se contraen por contacto con orina de portadores o indirectamente por contacto con aguas contaminadas. Es una enfermedad que se asocia con personas que trabajan en el campo o que tienen relación con animales.

Manifestaciones Clínicas

Son variables. Oscilan desde un síndrome catarla a cuadros en los que hay afectación hepática con ictericia y afectación renal.

Período de Incubación

Oscila de 3–30 días. Con el inicio de la sintomatología se produce la diseminación de la Leptospira en sangre y también pueden estar presentes en el líquido cefalorraquídeo.

Los Ac se detectan a los 15 días aproximadamente del comienzo de la enfermedad y alcanzan un nivel máximo entre la 3ª y 4ª semana.

Las Leptospiras aparecen en orina a los 7 días del inicio de la enfermedad y se puede prolongar su excreción durante 2 ó 3 meses.

Diagnóstico de Laboratorio

- ◊ Observación Directa: microscopio de campo oscuro (debe acompañarse de una prueba serológica)
 - En Sangre y Líquido Ceforraquídeo: presencia de Leptospira escasa.
 - En Orina
- ◊ Cultivo a partir de Sangre u Orina en un medio semisólido Fletcher: debe complementarse con antimicrobianos cuando la muestra es orina.
- ◊ Métodos Serológicos: se trata de métodos de aglutinación en los que se utilizan baterías de Ag de distintas serovariedades.

2.2 SECCIÓN 2: BACTERIAS GRAM-; AERÓBICAS/MICROAEROFÍLICAS; MÓVILES; HELICOIDALES/VIBRIOIDES

CAMPYLOBACTER

Son pequeños bacilos Gram- que tienen forma de coma, forma espiral y, en ocasiones, también se les puede observar en forma de S. Son microaerofílicos, móviles por un único flagelo polar y no esporulados. No fermentan carbohidratos y dan positiva la prueba de la Oxidasa y la Catalasa.

Campylobacter suele encontrarse en el tracto gastrointestinal de un gran número de animales y en el hombre producen infecciones gastrointestinales. También se les asocia, aunque en menor grado a infecciones extraintestinales, sobre todo en pacientes con SIDA.

ESPECIES CLÍNICAS

Las más importantes para el hombre, y que son agentes etiológicos de la diarrea son:

- Campylobacter jejuni
- Campylobacter coli
- Campylobacter lariidis

El Campylobacter fetus subespecie fetus produce cuadros de septicemia en pacientes con un sistema inmunitario deficiente.

Aislamiento a partir de muestras clínicas

Cuando se trata de un aislamiento a partir de heces es recomendable hacer el análisis lo más pronto posible. Si se va a retrasar, es necesario usar un medio de transporte: **Cary Blair ó Campy-Thio**, en los cuales se mantiene de 1 a 2 semanas a 4°C.

Las condiciones bajo las cuales deben realizarse los cultivos son:

- Utilizar medios de cultivo selectivos para estos microorganismos.
- Temperatura de incubación de 41°C (porque los más importantes son termofílicos).
- Condiciones reducidas de Oxígeno (microaerofílicos).

Medios Selectivos

- Skirrow
- Campy-BAP
- Butzler

Generalmente no se suelen usar medios de enriquecimiento cuando la muestra procede de heces. Sí es útil en aquellos casos en que está disminuido el número de bacterias por haber permanecido las heces durante un tiempo a temperatura ambiente.

También es importante usar un medio de enriquecimiento cuando la muestra procede de personas que están en tratamiento o en portadores.

Incubación

Se deben incubar a 42°C durante unas 72 horas, en el caso de Campylobacter jejuni y C.coli. De esta forma eliminamos la flora acompañante.

Para otras especies de Campylobacter:

- Utilizar medios selectivos sin cefaloesporinas
- Incubación a 37°C durante 7 días en atmósfera microaerofílica.

Métodos alternativos para el aislamiento de Campylobacter en heces

- ♦ Filtrar las heces (eliminamos coliformes y flora contaminante), diluir y se siembra en un medio NO selectivo. Se incuba a 42°C en ambiente microaerofílico.
- ♦ Colocar directamente el filtro sobre la superficie del agar. Echar 1 o 2 gotas de las heces sobre el filtro. Hacer una primera incubación, retirar el filtro y volver a reincubar.

Aislamiento de Campylobacter a partir de muestras de sangre

Se aíslan en sangre: C. fetus, C. jejuni, C. laridis y otros que generalmente pueden aislarse en sangre como agentes etiológicos de sepsis en pacientes con el sistema inmunitario deprimido o en enfermos de SIDA.

Aunque la mayoría crecen bien en medios con sangre, tienen el inconveniente de que tardan hasta 2 semanas en desarrollarse en estos medios. Es preferible realizar un cultivo en medios líquidos y, a partir de estos, realizar subcultivos en medios sólidos, en ambiente microaerofílico y a una temperatura de 37°C.

IDENTIFICACIÓN

La identificación cuando se sospecha la presencia del Campylobacter consiste en una **TINCIÓN DE GRAM**, en la cual se observan como bacilos Gram- que pueden adoptar una forma de S, aunque cuando la tinción de Gram se realiza a partir de cultivos viejos pueden perder esta morfología.

También se puede hacer un **MONTAJE EN FRESCO** para observar la movilidad; las pruebas de la **OXIDASA** y la **CATALASA** darán positivas y, para la diferenciación entre especies se pueden realizar las siguientes pruebas:

- Crecimiento a distintas temperaturas
- Sensibilidad que presentan al ácido nalidixico y cefalotina
- Producción de SH₂ en Agar Hierro de Kliger
- Reducción de Nitratos

Además de estas pruebas también se puede realizar la **SEROTIPACIÓN** mediante técnicas de Hemaglutinación Indirecta y Técnicas de Aglutinación en portaobjetos.

PATOGENIA. PATOLOGÍA

El que tiene mayor importancia desde el punto de vista clínico es el **C. jejuni**:

Campylobacter jejuni da lugar a gastroenteritis que se manifiesta con un cuadro diarreico y, en ocasiones puede observarse la presencia de sangre en heces. Este m.o se adquiere generalmente por vía oral como consecuencia de la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas. También se puede producir por contacto con animales infectados.

C. jejuni es un m.o muy sensible al pH ácido del estómago por lo que debe ingerirse un elevado número de m.o para que se produzca la infección.

Se multiplica en el intestino delgado, invade el epitelio y produce inflamación. En ocasiones también puede pasar al torrente circulatorio y desarrollar un cuadro de fiebre entérica. La diarrea que produce suele acompañarse de dolor abdominal, cefalea y fiebre.

Campylobacter coli y Campylobacter laridis producen una infección gastrointestinal similar a la producida por *C. jejuni*.

Campylobacter fetus y C. upsaliensis producen cuadros diarreicos en individuos normales y pueden ocasionar bacteriemia en pacientes con el sistema inmunitario deprimido.

HELICOBACTER PYLORI (1989) (Campylobacter piloridis/pilori 1983)

Se aísla en el estómago de pacientes con lesiones gástricas y úlcera gástrica. Es un bacilo Gram- con forma espiral y con una gran actividad ureasa. Es un m.o móvil y el interés en él reside en que se le considera como un importante factor de lesiones gástricas.

DETECCIÓN

Se pueden realizar MÉTODOS DIRECTOS dado que este m.o se localiza preferentemente en los pliegues de la mucosa del estómago. Las pruebas más idóneas para el aislamiento del mismo serán las biopsias de las zonas lesionadas (IMP: Las muestras deben proceder de Biopsias, NO de aspirados gástricos). Cuanto mayor sea el número de biopsias que se realicen, mas posibilidades habrá de conseguir el aislamiento de este m.o.

Las muestras procedentes de biopsias deben enviarse directamente al laboratorio para proceder a su cultivo y, si esto no fuese posible, es necesario utilizar un medio de transporte: Solución glucosada al 20%; Solución Salina o Caldo Tioglicolato. En estos medios de transporte, el microorganismo se mantiene viable durante aproximadamente 5 horas si la temperatura de conservación es de 4°C.

De las biopsias, una parte se utiliza para la realización de un frotis (TINCIÓN DE GRAM ó GIEMSA). En la tinción de Gram se observan bacilos Gram- con forma de espiral o una forma característica denominada forma de U o de Arnés de bueyes.

El resto de la muestra de la biopsia se trocea o machaca en un mortero estéril y posteriormente se siembra.

Además de las tinciones también se pueden realizar PRUEBAS BIOQUÍMICAS como la prueba de Reducción de Nitratos y la prueba de la Ureasa:

- Prueba Rápida: se realiza a partir de la muestra de la biopsia que se inocula en un medio para la determinación de urea, como por ejemplo, Caldo de Urea o Cristensen. Evidencia, cuando es positiva, que puede tratarse de H. Pylori.
- Prueba de la Urea Respiratoria: el paciente ingiere una urea marcada y tras un período determinado de tiempo se mide el nivel de CO₂ espirado.

Además de estos métodos también se utilizan los MÉTODOS SEROLÓGICOS que utilizan técnicas de ELISA con las que pueden ponerse de manifiesto la presencia de IgG e IgA.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de Campylobacter procedente de estas biopsias son:

- Agar Mueller–Hinton con 5% de sangre de carnero
- Agar Brucella con 1% de almidón soluble
- Agar sangre–chocolate–Skirrow–Thayer Martín, siempre que estén suplementados o bien con suero o bien con almidón.

Además de estos medios se pueden usar medios SELECTIVOS que incorporan antibióticos con el fin de inhibir la flora acompañante:

- Medio selectivo para Helicobacter pylori
- Medio Belo Horizonte

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, en ambiente microaerófilico, y la incubación debe mantenerse al menos durante 7 días cuando se trata de aislamiento primario.

FACTORES DE PATOGENICIDAD

- Producción de Ureasa ! Crea un ambiente alcalino (CO₂ y NH₃) que le protege de la acidez gástrica.
- Proteasas ! Modifica el pH gástrico de la mucosa.
- Hemaglutininas ! Se adhieren a las células epiteliales.
- Citotoxinas (no tienen un papel determinado).

PATOLOGÍA

- Gastritis aguda
- Úlceras pépticas: H. Pylori se ha aislado en el 100% de los enfermos que padecen úlcera duodenal y en un 80% de los enfermos que padecen una úlcera gástrica.

2.3 SECCIÓN 4: BACILOS Y COCOS GRAM–NEGATIVOS AERÓBICOS

FAMILIA I: PSEUDOMONADACEAE

Género I: PSEUDOMONAS

Género II: XANTHOMONAS

Género III: FRATEURIA

Género IV: ZOOGLOEA

GÉNERO I: PSEUDOMONAS

Las especies de este género son bacilos Gram–, aerobios estrictos, Oxidasa+ y móviles por un flagelo polar. No fermentan ningún tipo de carbohidrato pero pueden utilizar los azúcares por metabolismo oxidativo.

• *Pseudomona aeruginosa*

Es un m.o que crece bien en la mayor parte de los medio habituales de laboratorio, entre ellos MacConkey y Levine. No fermenta ningún carbohidrato y es capaz de crecer a temperaturas de 42°C.

En Agar Sangre da lugar a colonias de morfología variable, en ocasiones –hemolíticas y con un olor característico a fruta. Elabora pigmentos hidrosolubles que colorean el agar como la piocianina de color azul, pioverdina de color verde y piorrubina de color rojo. Es la única especie que produce piocianina, característica que se puede utilizar para su identificación. La producción de pigmentos se puede potenciar recurriendo a medios especiales como, por ejemplo, el King A y el King B.

Además existen medios selectivos para el aislamiento de *P.aeruginosa* a partir de muestras contaminadas como heces y esputo como son el Agar Cetrimida y el Agar Irgarsen.

IDENTIFICACIÓN DE LA P.AERUGINOSA

Las características que ayudan a la identificación de *P.aeruginosa* son:

- ◆ Crecimiento en la mayor parte de los medios de cultivo
- ◆ En Agar Sangre dan colonias azul-verdosas con olor afrutado
- ◆ Catalasa y Oxidasa+
- ◆ Reducción de Nitratos
- ◆ Crecimiento a 42°C
- ◆ En Agar de Kligler produce un crecimiento en superficie sin viraje del medio
- ◆ Oxidación de Glucosa en un medio de Oxidación–Fermentación.
- ◆ Hidrólisis de Arginina
- ◆ No decarboxilan ni Lisina ni Ornitina
- ◆ Tolerancia a la Cetrimida

PATOGENICIDAD Y PATOLOGÍA DE LA P.AERUGINOSA

La *P.aeruginosa* posee un gran número de factores de virulencia que se encuentran implicados en los mecanismos de patogenicidad del m.o, entre ellos fimbrias, que permiten su adherencia a células epiteliales; cápsula polisacárida, que le protege de la fagocitosis; enzimas extracelulares, como proteasas, hemolisinas y coagulasas; y endo y exotoxinas.

Posee además, la capacidad de sobrevivir en medios con bajo contenido en nutrientes, especialmente en ambientes húmedos, de forma que se ha llegado a aislar en agua destilada y soluciones desinfectantes.

P.aeruginosa se haya implicada en un gran número de procesos infecciosos aunque siempre como patógeno oportunista y en pacientes con algún tipo de alteración en su inmunidad. Es causante de infecciones nosocomiales. Puede producir también infecciones oculares asociadas al uso de lentes de contacto, otitis media en nadadores y, en ocasiones, puede producir septicemias.

• *Pseudomona mallei* y *Pseudomona pseudomallei*

Son las únicas especies del grupo consideradas como verdaderos patógenos.

P.mallei es el agente etiológico del Muermo, enfermedad que se transmite al hombre a través del ganado equino. A diferencia del resto de las especies del género, no habita ni en el agua ni en el suelo, sino que se encuentra perfectamente adaptada al hombre y animales a quien parasita.

P.pseudomallei es de vida libre y se encuentra en el agua y en el suelo. Es el agente etiológico de la Melioidosis, una infección rara en nuestro medio y que se manifiesta de diversas formas, como infección pulmonar, abscesos, septicemia, etc. En el laboratorio crece en agar sangre dando colonias umbilicadas, de crecimiento lento y con una zona de hemólisis alrededor. Puede crecer en Agar MacConkey y a temperaturas de 42°C.

- **Otras Pseudomonas**

- ♦ P.cepacia: produce fibrosis quística
- ♦ P.fluorescens, P.pútida, P.putrefaciens y P.alcaligenes: se suelen aislar como agentes infecciosos en pacientes cuyas defensas se encuentran comprometidas.

Pruebas Bioquímicas para la identificación de Pseudomonas (mirar fotocopias)

FAMILIA VIII: NEISSERIACEAE

Género I: NEISSERIA

Género II: MORAXELLA ó BRANHAMELLA CATHARRALIS

Género III: ACINETOBACTER

Género IV: KINGELLA

GÉNERO I: NEISSERIA

Son Cocos Gram-, aerobios estrictos que generalmente se presentan en parejas. Su morfología se asemeja a la forma de un riñón o de granos de café. Son inmóviles, pueden presentar cápsula y algunos producen un pigmento de color amarillo.

Son Oxidasa y Catalasa+, fermentan los carbohidratos con producción de ácido pero sin producción de gas. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y, algunas cepas, se pueden desarrollar mejor en una atmósfera que contenga CO₂.

Estos m.o no resisten la desecación ni la exposición prolongada a la luz y, en estas condiciones, elabora enzimas autolíticas que conducen a su autodestrucción.

Se localizan habitualmente en las mucosas de los tractos respiratorios, digestivo y genitourinario del hombre y los animales.

Únicamente, las especies de *N.meningitidis* y *N.gonorrhoeae* se consideran patógenos primarios y ambos infectan exclusivamente al hombre.

- **IDENTIFICACIÓN**

Las especies de *Neisseria* se identifican por las siguientes características:

- ♦ Producción de pigmento
- ♦ Prueba de la Catalasa

- ◆ No reducen los Nitratos
- ◆ Producción de ácido a partir de carbohidratos sin producción de gas
- ◆ Prueba de la ADNasa que permite diferenciar al género *Neisseria* (negativo) del género *Branhamella* (positiva)
- ◆ *N.gonorrhoeae* se diferencia de la *N.meningitidis* porque la primera únicamente fermenta la Glucosa, mientras que la segunda fermenta tanto la Glucosa como la Maltosa.

Además de los métodos de identificación, basados en pruebas bioquímicas, se han desarrollado métodos de detección inmunológicos que permiten la identificación de *N.gonorrhoeae* directamente a partir del cultivo.

N.gonorrhoeae se puede diagnosticar también a partir de muestras clínicas como son los exudados uretrales y endocervicales mediante técnicas de ELISA.

• **Neisseria gonorrhoeae**

El aislamiento de *N.gonorrhoeae* a partir de muestras clínicas se realiza a partir de muestras no estériles procedentes del tracto genital y la orofaringe, que contiene gran cantidad de flora acompañante. Por ello, se recurre a medios selectivos como, por ejemplo, el medio Thayer–Martin cuya composición es Agar Chocolate suplementado con antibióticos:

- ◆ Colistina: inhibe el crecimiento de los Gram–.
- ◆ Nistatina: inhibe el crecimiento de la levaduras.
- ◆ Vancomicina: inhibe el crecimiento de las Gram+.
- ◆ Trimetropio: inhibe el crecimiento de *Proteus*.

Además de este medio, también se puede utilizar el medio NYC (New York City) de características similares al anterior.

Además de un medio selectivo, es conveniente utilizar un medio general como el Agar Chocolate, ya que el medio anterior, por el alto contenido en antibióticos, puede impedir el crecimiento de hasta un 10% de las *Neisserias* presentes en la muestra.

Para favorecer el crecimiento, las placas deben incubarse en atmósfera húmeda y con una concentración de CO₂ de entre un 5–10%. Tras 24–48 horas de incubación se observan en el medio de cultivo colonias pequeñas y grisáceas. Paralelamente al cultivo se realiza una tinción de Gram, donde estos m.o se observan como diplococos Gram–, incluidos en el interior de leucocitos polimorfonucleares.

El examen directo de la muestra es muy útil cuando se realiza a partir de exudados uretrales y, en menor grado, cuando se trata de exudados endocervicales.

El PATRÓN ANTIGÉNICO de la *N.gonorrhoeae* es un patrón complejo, capaz de modificarse para evitar la respuesta inmunitaria del huésped. Estos componentes antigénicos están constituidos por pili, lipopolisacáridos, proteasas IgA y proteínas:

- Proteína I ó POR (porina)
- Proteína II u OPA (opacidad): es la más importante. Su acción es mantener la adherencia entre las células bacterianas y las células epiteliales de la mucosa, dando lugar a la formación de un complejo que se denomina unidad infecciosa
- Proteína III ó Rmp: asociada a proteína I.

PATOLOGÍA:

La *N.gonorrhoeae* es el agente etiológico de la gonorrea, una enfermedad que se transmite casi exclusivamente por contacto sexual. El gonococo es un m.o muy infeccioso, de modo que un único contacto con un individuo portador tiene una probabilidad de adquirir la infección de un 20–30% en el caso de los hombres y de un 50–70% en el caso de las mujeres.

En el hombre, la manifestación más común de la infección es la uretritis aguda, cuyos síntomas clínicos son la aparición de disuria y la descarga uretral purulenta. El período de incubación es de 2 a 5 días tras la exposición al m.o. El proceso se puede complicar y producirse prostatitis y obstrucción uretral.

En las mujeres y, tras un período de incubación definido, el primer tejido afectado es el endocervix desde donde pasa a la vagina y uretra. La infección se acompaña de una secreción vaginal mucopurulenta, nisturia y frecuencia en la micción. En algunos casos puede evolucionar y producir salpingitis. Un 20% de las mujeres son salpingitis gonocócica se vuelven estériles. En los casos más graves, la salpingitis aguda puede evolucionar hacia una peritonitis y a la aparición de abscesos hepáticos. (13/11/01)

Hasta un 50% de las mujeres y, en menor proporción los hombres, pueden ser portadores asintomáticos del gonococo, contribuyendo de este modo a su diseminación. En un bajo porcentaje de individuos, los gonococos se diseminan en sangre y dan lugar a bacteriemia, caracterizada por lesiones en la piel, preferiblemente en las extremidades y a una artritis supurativa en las articulaciones.

Los gonococos, en raras ocasiones, son agentes etiológicos de meningitis e infecciones oculares en adultos. Los neonatos pueden adquirir gonococia ocular en el canal del parto a partir de madres infectadas por *N.gonorrhoeae*.

- **Neisseria meningitidis**

El meningococo es un m.o exigente en las condiciones de crecimiento. Es inhibido por un gran número de sustancias presentes en los medios habituales. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede con el gonococo, el meningococo es capaz de desarrollarse en Agar Sangre.

AISLAMIENTO

Agar Sangre y Agar Chocolate son los medios que se emplean en el aislamiento de *N.meningitidis* a partir de muestras normalmente estériles como, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo. Para muestras contaminadas con flora acompañante, se emplearán medios selectivos como Thayer–Martin.

En medio sólido, el meningococo crece dando lugar a pequeñas colonias, transparentes, no pigmentadas y no hemolíticas. Las especies capsuladas dan lugar a colonias de aspecto mucoso.

Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera entre el 5–10% de CO₂ y no se deben descartar como negativas hasta 5 días después de su siembra.

PATRÓN ANTIGÉNICO

El polisacárido capsular producido por *N.meningitidis* permite clasificar a este m.o en 13 serogrupos. La detección de Ag capsulares en muestras orgánicas mediante técnicas de aglutinación permite el diagnóstico precoz de la enfermedad.

El meningococo posee además otros determinantes antigénicos como son las proteínas de membrana, los pili y el lipopolisacárido, responsable de la mayor parte de los efectos citotóxicos de la infección meningocócica.

PATOLOGÍA

Neisseria meningitidis es solo un patógeno en el hombre al que coloniza a través de la nasofaringe. Los m.o se adhieren a las células de la faringe y, de ahí, pueden pasar a la sangre y producir desde fiebre transitoria y bacteriemia hasta meningitis. La meningitis es la complicación más grave y más frecuente como consecuencia de a inseminación sanguínea. El comienzo de los síntomas meníngeos es brusco, con dolor intenso de cabeza, vómitos y rigidez de nuca. La presencia de meningococos en sangre se suele manifestar con la aparición de petequias, que son lesiones hemorrágicas localizadas generalmente en el tronco y parte inferior del cuerpo.

Las meningitis producidas por un *N.meningitidis* suelen ocurrir por brotes epidémicos. Los niños entre 6–12 meses y los adolescentes son los que se afectan con mayor frecuencia. Entre un 2–30% de la población puede ser portadora y, sin embargo, no desarrollar síntomas de la infección.

N.meningitidis puede dar lugar también a artritis y, con menor frecuencia, neumonía y faringitis.

- **Otras especies de *Neisseria***

N.lactamica, *N.cinerea*, *N.polycacharea*, *N.flavescens*, *N.sicca*, *N.mucosa* y *N.elongata*.

Estas especies de *Neisseria* son habitantes normales de la nasofaringe y orofaringe y se consideran especies de baja patogenicidad, aunque pueden verse implicadas en ciertos procesos infecciosos como meningitis, endocarditis, pericarditis y neumonía.

GÉNERO II: MORAXELLA ó BRANHAMELLA CATHARRALIS

Es un coco Gram–, Oxidasa y Catalasa–, no fermenta ningún azúcar, da positiva la prueba de la ADNasa y reduce los Nitratos, lo que le diferencia de las *Neisserias*. Crece bien en Agar Sangre y Agar Chocolate a la temperatura de 37°C y en atmósfera de aire o CO₂.

Esta bacteria forma parte de la flora normal del trato respiratorio superior de individuos sanos, aunque en ocasiones se ha aislado como patógeno en meningitis y endocarditis. Este m.o es responsable de un 10–15% de otitis media y es un agente etiológico importante como causa de sinusitis.

GÉNERO III: ACINETOBACTER

Este género engloba m.o que se encuentran habitualmente en el suelo y en el agua. Se puede hallar presentes en ambientes hospitalarios, donde producen infecciones en pacientes con las defensas disminuidas.

Dos especies son las que se aíslan con más frecuencia:

- *A.calcoeticus*–subespecie *anitratus*
- *A.calcoeticus*–subespecie *Iwoffii*

Estos m.o se han aislado en pacientes con neumonía, infección urinaria y sepsis. En el laboratorio crecen en Agar MacConkey y en Agar Sangre donde dan colonias grises rodeadas de una zona de hemólisis.

Se diferencian de las *Pseudomonas* porque dan negativa la prueba de la Oxidasa, son Catalasa+ y no reducen los Nitratos.

Al microscopio se observan como bacilos Gram– que, en ocasiones, pueden confundirse con las *Neisserias*.

OTROS GÉNEROS

- **Brucella**

Son Coco–Bacilos, Gram–, inmóviles, no esporulados y aerobios estrictos. Algunas especies de Brucellas pueden presentar cápsula.

Al microscopio se observan agrupados en parejas o formando cadenas cortas. La temperatura óptima de crecimiento es de 35–37°C.

Son Catalasa+. La mayor parte de las Brucellas dan positiva la prueba de la Oxidasa y reducen los Nitratos a Nitritos.

Las especies de Brucellas son parásitos obligados de animales y, algunos de ellos, producen infección en el hombre.

DIAGNÓSTICO A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS

- **Examen Directo:** El examen de la muestra, previa tinción de Gram, ofrece pocos resultados, debido al escaso número de m.o que puede contener. La técnica del Ac fluorescente directo, que emplea Ac anti–Brucella marcados con fluoresceína, proporciona mejores resultados que la tinción de Gram.

Las tinciones ofrecen un diagnóstico de presunción que no es definitivo por lo que siempre hay que realizar el cultivo de las muestras.

- **Aislamiento de la Brucella. Medios de cultivo:** realizamos el aislamiento cuando no se puede realizar la identificación directamente de la muestra clínica.

Las Brucellas son m.o intracelulares, por lo que necesitan requerimientos nutricionales complejos.

El cultivo se realizará, por lo tanto, en medios enriquecidos, aunque hay Brucellas que se pueden desarrollar en medios generales como Agar Sangre y Agar Chocolate:

- **Medios de cultivo Líquidos:** Caldo Brucella.
- **Medios de cultivo Sólidos:** Agar Brucella complementado con suero o glicerina.
- **Medios de cultivo Selectivos:** Medio de Farrell; Medio modificado de Thayer–Martin.

A todos los enfermos sospechosos de infección por Brucellas se les debe realizar un hemocultivo.

- **Identificación de Brucellas**

Basada en la Morfología de las colonias:

- ♦ Lisas y transparentes: están relacionadas con la presencia de cepas virulentas. Presenta tanto la parte lipídica A como la parte polisacárida O.
- ♦ Rugosas: están relacionadas con cepas avirulentas. Sólo poseen la parte lipídica A, y si poseen la parte polisacárida, ésta es defectuosa, por lo que no se consideran virulentas.

Otra forma de diferenciar las formas virulentas de las avirulentas es sembrar en un medio Agar Glucosa Glicerol. Una vez incubada la placa inundamos la superficie de la placa con una solución de cristal violeta y observamos con una luz oblicua. Las colonias lisas se observarán de un azul verdoso, mientras que las colonias rugosas se observarán de un azul rojizo o violeta rojizo.

Tinción de Gram:

Las Brucellas aparecen como coco–bacilos Gram– que se tiñen débilmente con el colorante de contraste, por

lo que es necesario mantener la acción del colorante de contraste (Safranina) por lo menos durante 3 minutos.

Es conveniente, antes de hacer la tinción de Gram, que si se sospecha la presencia de Brucellas, hagamos una suspensión de una colonia en una solución salina fenicada al 1%, para evitar riesgos.

Pruebas Bioquímicas:

Son Catalasa+, la mayoría dan positiva la prueba de la Oxidasa, son Ureasa+, reducen los Nitratos a Nitritos y no fermentan la Glucosa ni la Lactosa.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (diagnóstico indirecto)

- Prueba de la Rosa de Bengala
- Aglutinación en tubo
- Prueba de antiglobulina para Brucella (Coombs indirecto)

La **Prueba de la Rosa de Bengala** y la **aglutinación en tubo** se realizan de la misma forma. Son pruebas de aglutinación que se realizan con una suspensión de Brucellas a pH = 3,6. Para la prueba se preparan una serie de diluciones:

Dilución 1/2 : 100 L de suero problema + 100 L solución salina

Dilución 1/4 : 100 L dilución anterior + 100 L solución salina

Dilución 1/8: 100 L dilución anterior + 100 L solución salina

...etc.

Una vez hechas las diluciones, colocamos 50 L de las mismas en un porta y le añadimos 1 gota de la suspensión de Brucellas.

Primero se detecta la presencia de la Brucella y después se realiza la cuantificación de la misma. Para que la prueba se positivice, el paciente debe tener una concentración de Ac en suero de 25 UI/mL o superior. Para conocer este dato calculamos el título:

$\text{TÍTULO} = 25 \text{ UI/mL} \times \text{Inversa de la Dilución}$

Las pruebas se deben repetir a los 15 días después de la seroconversión:

- Siempre que aumenta el título de Ac de una fase a otra significa que se encuentra en una fase aguda.
- Si el título se mantiene, pueden darse dos situaciones:
 - ◆ Que se trate de Ac residuales
 - ◆ Que se trate de una infección crónica

La **Prueba de la antiglobulina para Brucella ó Coombs indirecto** sirve para detectar Ac bloqueantes (IgA, que se encuentran en las mucosas)

Enfrentamos el suero de paciente con la solución de brucellas e incubamos. El Ac bloqueante se une al Ag, pero no produce la aglutinación. Para saber si realmente existe el Ac bloqueante o simplemente es que no existe, añadimos la antiglobulina humana o suero de Coombs.

Si se produce la aglutinación significará que en el suero del paciente existía el Ac bloqueante, ya que la

antiglobulina humana se ha unido a este Ac y ha aglutinado.

Si no se produce la aglutinación significa que no existía Ac en el suero del paciente.

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BRUCELLAS

Las principales especies de Brucella con importancia patológica son:

- **B. melitensis:** produce la mayor parte de los casos de Brucelosis que se producen en España.
- **B. abortus:** producen una infección más leve que la melitensis. A veces cursa de forma asintomática y es la causante de muchos de los abortos espontáneos que se dan en los animales.
- **B. suis:** suele afectar al ganado porcino pero tiene menos importancia desde el punto de vista clínico.

La Brucelosis es una zoonosis, es decir, que afecta a los animales de forma primaria y pueden transmitirse al hombre. La infección puede producirse tanto por:

- Contagio Directo: se puede producir como consecuencia de un contacto con animales infectados o bien por inhalación de aerosoles, o por contacto de productos infectados con las mucosas.
- Contagio Indirecto: se produce como consecuencia de ingestión de leche y sus derivados que no han sido pasteurizado.

Es importante destacar el peligro que supone para el personal sanitario la manipulación de muestras sospechosas de Brucelosis ya que es fácil que pueda producirse el contagio por contacto con piel y mucosas, por inhalación de aerosoles y por accidentes como consecuencia de la manipulación de agujas contaminadas en la realización de los hemocultivos.

PATOGENIA

Generalmente, las Brucellas tienen un período de incubación que puede oscilar entre 1–6 semanas. Durante este período, las Brucellas se multiplican en el interior de las células del retículo endotelial y, de esta forma, elude la respuesta inmune del huésped.

Pueden pasar a la sangre y diseminarse en los tejidos. Es frecuente que la infección se localice en algún órgano, generalmente hígado y médula ósea.

- **Bordetella** (Continuación de Otras especies)

Son pequeños bacilos Gram–, aerobios estrictos, parásitos obligados de animales y hombre. Se localizan en la mucosa del tracto respiratorio y se adhieren a las células ciliadas mediante fimbrias. No fermenta azúcares, débilmente positivos en la prueba de la Catalasa y, algunas, pueden dar positiva la prueba de la Urea y la Reducción de Nitratos.

Las especies más importantes desde el punto de vista clínico son:

- **Bordetella pertussis y parapertussis:** producen Tosferina
- **Bordetella bronchiseptica:** produce infecciones respiratorias, pero nunca tosferina.

BORDETELLA PERTUSSIS

Aislamiento

Las muestras más adecuadas para el cultivo de Bordetella son los exudados faríngeos y los exudados

bronquiales. Las Bordetellas son m.o muy lábiles por lo que deben cultivarse inmediatamente en medios especiales.

El medio clásico para el aislamiento de Bordetella es el medio de Bordet–Gengou. Los medios que se utilizan para el aislamiento de Bordetella suelen contener antibióticos para evitar el crecimiento de la flora orofaríngea habitual, especialmente *S. aureus*, que puede inhibir el crecimiento de Bordetella. Las placas se incuban a 35–37°C en atmósfera húmeda. En este medio de cultivo, tras 5 ó 7 días de incubación, las colonias son pequeñas y de color blanco (aspecto perlado), que se asemeja a gotas de Mercurio.

Identificación:

Se puede realizar una tinción de Gram, en la cual Bordetella se observa como pequeños coco–bacilos débilmente Gram–, por lo que habrá que mantener por más tiempo el colorante de contraste.

También se puede realizar una tinción con Ac fluorescentes y, por último técnicas serológicas, que tratan de poner de manifiesto la elevación de las inmunoglobulinas de las clases IgM, IgG e IgA.

Epidemiología:

Bordetella pertussis sobrevive durante poco tiempo en el ambiente, por lo que el mecanismo de infección va a ser por contacto directo de persona a persona mediante gotas de saliva.

La fase inicial de la Tos ferina es de 7–10 días. En general consta de tres fases:

- **Fase inicial o catarral:** la clínica se manifiesta de forma similar a un resfriado.
- **Fase paroxística:** se producen frecuentes accesos de tos. Este cuadro característico de la Tosferina se produce como consecuencia de que el m.o se une a los cilios de la traquea de forma que impide la acción de éstos. Como consecuencia se acumula la mucosidad y, al mismo tiempo, por acción de una toxina producida por la bacteria, origina la pérdida de las células ciliadas. Los accesos de tos se producen para tratar de eliminar la mucosidad que se acumula en las vías respiratorias. Los movimientos que hace el enfermo para tratar de que penetre el aire, produce un sonido característico de la Tosferina. En ocasiones, y sobre todo en niños pequeños, esta acumulación de mucosidad puede producir la muerte por asfixia.
- **Fase de convalecencia:** puede durar varios meses.

Prevención ó Profilaxis:

Se realiza por vacunación a partir de los dos meses, cuando disminuyen los Ac procedentes de la madre. Esta vacuna se asocia con la Difteria y el Tétanos.

Las vacunas pueden ser:

- **Celulares:** Utilizan células enteras de Bordetella que están muertas o parcialmente inactivadas.
- **Acelulares:** Contienen uno ó más Ag derivados de componentes activos de la Bordetella.
 - ♦ **Francisella** (Continuación de Otras Especies)

La más importante es la *F. Tularensis* que es un coco–bacilo Gram–, aerobio estricto, inmóvil, no esporulado y responsable de una enfermedad denominada Tularemia.

Este m.o forma parte de la flora orofaríngea de un gran número de animales salvajes desde donde pasa al hombre por varias vías:

- Inhalación, por aerosoles: da lugar a un cuadro neumónico.
- Ingestión de carne infectada o insuficientemente cocinada.
- Picaduras: tábanos y piojo de los conejos.
- Abrasiones de la piel: contacto con animales (conejos).

El período de incubación de la Tularemia es de 3–4 días. El paciente presenta fiebre con escalofríos, dolor de cabeza e inflamación de ganglios linfáticos. En la forma más común de Tularemia se observa una lesión localizada en el lugar donde se ha producido la entrada de la bacteria.

El **Diagnóstico de Laboratorio** se puede realizar mediante tinción fluorescente. Para su cultivo es necesario utilizar medios complejos que deben contener cistina y cisteína.

Algunos de los medios habituales para el aislamiento de Francisella son:

- Agar Glucosa Cistina enriquecida con sangre de conejo al 5%
- Agar Chocolate enriquecido con cistina.

Las placas se incuban a 35–37°C y tras la incubación aparecen colonias pequeñas de color verde que se pueden identificar por aglutinación con antisueros específicos.

2.4 SECCIÓN 5: BACILOS GRAM-NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS

FAMILIA I: ENTEROBACTERIACEAE.

Son bacilos Gram–; Catalasa+; Oxidasa–; anaerobios facultativos...

Fermentan la glucosa con producción de ácido, con ó sin gas.

La mayor parte reduce los nitratos a nitritos, pueden ser móviles o inmóviles. Cuando son móviles, la mayoría presenta flagelos peritricos.

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, habitan tanto a plantas como animales y suelo, y en el hombre se encuentran como flora comensal en el intestino. Son responsables de un gran número de infecciones, siendo particularmente frecuente su aislamiento a partir de determinadas muestras clínicas. Son responsables del 50% de los casos de septicemia; de 60–70% de los casos de enteritis bacteriana aguda y más del 70% de los casos de infecciones del tracto urinario.

• **ESTRUCTURA ANTIGÉNICA**

- ◊ Ag somático O: se encuentra en la pared celular y tiene naturaleza polisacárida.
- ◊ Ag capsular K: polisacárido o proteína.
- ◊ Ag flagelar H: naturaleza proteica.
- ◊ Endotoxinas.
- ◊ Exotoxinas.
- ◊ Colicinas: Son bacteriocinas,. Son toxinas contra otras cepas de la misma o distinta especie.

· **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN**

Todas aquellas muestras clínicas en las que se sospecha la presencia de Enterobacterias, generalmente procedentes de heridas, líquidos y exudados orgánicos, orina y hemocultivos, deben sembrarse en un medio general (Agar sangre o chocolate) ó en un medio selectivo.

Si la muestra procede de heces o hisopos rectales, se utilizarán medios selectivos diferenciales ó caldos de

enriquecimiento.

• **MEDIOS DE CULTIVO**

En función del origen de la muestra, podemos utilizar distintos medios de cultivo. Los que se utilizan más frecuentemente son:

◇ **Medios de cultivo poco selectivos:**

- Agar Mc Conkey
- Agar EMB Levine

• **Caldo de crecimiento:**

- ◆ Selenito–Salmonella
- ◆ Tetratiónato–Salmonella–Shigella (Toxoinfecciones alimentarias)

◇ **Medios de cultivo de Selectividad media–alta:**

- Agar enterico Hecktren
- Agar salmonella–Shigella
- Agar verde brillante (para todo tipo de Salmonellas, excepto la *S. typhi*)
- Agar bismuto sulfito (selectivo para *S. typhi*)

• **PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIACEAS**

- ◇ Pruebas Bioquímicas.
- ◇ Sistemas comerciales de identificación.
- ◇ Identificación serológica: permite la identificación a nivel de género y especie.
- ◇ Diagnóstico inmunológico.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Agar hierro de Kligler: Es una prueba diferencial y además se trata de una multiprueba. Se compone de dos hidratos de carbono (Lactosa en un 1% y Glucosa en un 0,1%). La Glucosa se encuentra en menor cantidad para que se consuma antes de las 24 horas de incubación y necesariamente las bacterias tengan que consumir las peptonas, con lo que se produce amoníaco y se alcaliniza el medio.

• **3 formas básicas de fermentación en este medio de cultivo:**

- ◇ **Que solamente se fermente la Glucosa:** por principio, todas las enterobacteriaceas fermentan la glucosa. Cuando la glucosa se acaba y la bacteria no es capaz de utilizar la lactosa, se alimentará de las peptonas del medio.

Método: la siembra se hace en profundidad (condiciones anaerobias) y en superficie (condiciones aerobias). La muestra debe proceder de un medio de cultivo puro, se tomará una colonia con un hilo de siembra y se hará la inoculación del medio de cultivo primero en profundidad, y segundo, según saquemos el asa, en superficie. La lectura se realizará tras un tiempo de incubación de 24 horas (que se ha de cumplir a rajatabla) a 35–37°C.

Resultados: Si se fermenta la Glucosa, se producen unos compuestos que acidifican el medio y, por lo tanto, el medio virará a amarillo. Si además de la Glucosa utiliza las peptonas, que producen amoníaco, el medio se alcaliniza y en lugar de virar a amarillo virará a rojo intenso. Esto último solo ocurre en la siembra que se ha hecho en la superficie, es decir, que veremos la superficie roja y el fondo amarillo. Esto es así porque los productos metabólicos son diferentes si la transformación es aeróbica o anaeróbica.

- ◇ **Que fermente tanto la Glucosa como la Lactosa:** Se observará el medio totalmente amarillo, debido al pH ácido.
- ◇ **Que no fermente ninguna:** se alimenta desde el principio de las peptonas, por lo tanto

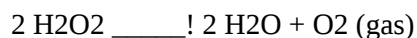
podremos afirmar que no se trata de una Enterobacteria. Se originarán una serie de productos alcalinos que virarán el medio a rojo tanto en el fondo como en la superficie, siempre y cuando la bacteria sea capaz de consumir las peptonas tanto en medio aerobio como anaerobio. Si la bacteria solo fuera capaz de utilizar las peptonas de forma aerobia, la superficie aparecería roja, mientras que el fondo permanecería sin cambios.

- Observación de la producción de gas (CO₂ y H₂): Si en el medio se forma alguno de estos gases, se observarán algunos cambios en el medio de cultivo:
 - Aparición de burbujas.
 - Fracturas en el agar.
 - Desplazamiento del medio de cultivo hacia la boca del mismo debido a una producción intensa de gas.
- ♦ Observación de la producción de Sulfhídrico (SH₂). Para que se produzca el SH₂
 - ◇ Las condiciones han de ser ácidas
 - ◇ Se necesita una fuente que suministre el azufre (Tiosulfato de Sodio)
 - ◇ Se necesita un indicador que nos permita visualizarlo (Sal de hierro! Citrato Férrico Amoniacal). Este indicador hace que el SH₂ precipite en forma de un precipitado negro. Si la cantidad precipitada es pequeña, el precipitado se observará en la superficie del medio de cultivo. Si, por el contrario, la producción de SH₂ es muy intensa, toda la parte profunda del tubo se verá negra. Ahora bien, si todo el fondo se ve negro ¿cómo sabremos el viraje del medio?. Pues bien, como para que se pueda producir el Sulfhídrico es necesario que se den unas condiciones ácidas, deberemos suponer que el medio de cultivo habrá virado a amarillo en el fondo. En la superficie si podremos diferenciar entre el rojo y el amarillo sin ningún problema.

Prueba de la Catalasa

Definición: Es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (a excepción del Estreptococcus, por eso es una prueba que nos permite diferenciar entre Estafilococos y Estreptococos).

Función: Descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂ o agua oxigenada) que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares:



catalasa

Técnica: Consiste en recoger con el asa de siembra una colonia procedente de un cultivo puro, reciente y colocarla sobre un portaobjetos. A continuación agregamos 1 gota de peróxido de hidrógeno al 30%(comercial) sobre el microorganismo con una pipeta Pasteur (no es necesario homogeneizar).

Resultados:

- Si la prueba es POSITIVA: se formarán inmediatamente burbujas bien visibles.
- Si la prueba es NEGATIVA: no se observará burbujeo.

Precauciones: es importante que la muestra no tenga su origen en un medio que contenga sangre, ya que podríamos obtener falsos positivos.

Prueba de la Oxidasa o Citocromooxidasa

Principio: se basa en determinar la presencia de las enzimas oxidasas, las cuales catalizan la transferencia de electrones desde el sustrato, que es generalmente orgánico, hasta el oxígeno.

Técnica: Se realizará según las instrucciones de la casa que nos proporcione el producto. Generalmente, en las oxidasas positivas, se produce una reacción entre la enzima y un sustrato que está en la tira reactiva dando lugar a un producto coloreado que suele ser el azul de indofenol. El reactivo puede variar de una casa comercial a otra, así una prueba oxidasa+ se observará de un color que oscila entre el púrpura y el negro.

Precauciones: No tomar la muestra de medios coloreados.

Prueba del Indol

Principio: se basa en determinar la capacidad de un microorganismo para desdoblar el indol de la molécula de triptófano, que es un aminoácido, que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar metabolitos indólicos. A este grupo de enzimas, capaces de desdoblar el triptófano se les denomina triptofanasas.

Técnica: Se utiliza un caldo de triptona o de peptona (a veces también se utiliza un medio semisólido: medio de S.I.M = Sulfídrico; Indol; Movilidad). Se disponen 5 mL del medio en cada uno de los tubos que vayamos a utilizar para la prueba, esterilizamos, inoculamos e incubamos (35–37°C / 24h). Por último, para saber si se ha producido el Indol añadimos 5 gotas del reactivo de Kovacs indol.

Resultados:

- Si la prueba es POSITIVA: aparece un anillo rojo en la superficie del medio.
- Si la prueba es NEGATIVA: permanece un color amarillo, que es el color del reactivo (el reactivo es un aldehído)

Prueba del Citrato

Principio: consiste en determinar si una bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono alcalinizando el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado para observar la fermentación de citrato contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono, utiliza también las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Estas sales de amonio se van a desdoblar en amoníaco produciendo la consiguiente alcalinidad. El medio utilizado es el Agar Citrato de Simmons que lleva como indicador el azul de bromotimol (cuando el pH es alcalino vira a azul intenso, mientras que el medio sin inocular tiene un color verde).

Técnica: Se utiliza un tubo inclinado. Hacemos la estría en superficie con un inóculo poco denso y lo llevamos a incubar (35–37°C / 24h)

Resultados:

- Si la prueba es POSITIVA: En la superficie del medio de cultivo se observa un viraje del verde a azul intenso.

- Si la prueba es NEGATIVA: no se produce viraje, se queda verde.

Prueba del Rojo Metilo–Voges Proskauer (RM–VP) (30/10/01)

INTRODUCCIÓN: Para el metabolismo de los Hidratos de Carbono se pueden dar varios procesos:

- **Glucólisis:** proceso de hidrólisis por el cual se transforma la glucosa en ácido pirúvico.
- **Vías alternativas**
 - ♦ Pentosas fosfato: se puede usar al mismo tiempo que la Glucólisis o de forma independiente.
 - ♦ Entner Douduroff: la utilizan algunas Enterobacterias sin necesidad de utilizar la Glucólisis y la vía de las pentosas fosfato.

El ácido pirúvico puede usarse mediante:

◊ **Vía aeróbica:** Respiración.

- El aceptor final de electrones es una molécula inorgánica (O₂).
- Como productos obtenemos CO₂ y H₂O
- Empeacetilo + CoA ! ciclo de Krebs + cadena transportadora de e⁻

• **Vía anaerobia:** Fermentación.

- ♦ El aceptor final de electrones es una molécula orgánica.
- ♦ Es de menor rendimiento energético que la Glucólisis.
- ♦ Puede ser de tres tipos:

◊ Láctica

◊ Alcohólica

◊ Ácido mixta o del Grupo Califorme: tiene como productos:

- ♦ Ácidos mixtos: fórmico, acético, succínico, etílico... **(RM+)**
- ♦ Butilenglicol ó Butanediol ! Acetoína **(RM-)**

Rojo de metilo (RM)

Principio: Es una prueba que mide de forma cualitativa los productos ácidos que se originan por el metabolismo de la Glucosa de forma que, cuando estos ácidos se producen en cantidad elevada, consiguen superar el sistema amortiguador llevando el pH del medio hasta 4 – 4,5.

Técnica: Se siembra 1 tubo para la prueba RM y otro para la de VP para cada muestra. Se incuba a 30–37°C durante 48 horas a 4 días ó incluso 6 días, y finalizado el período de incubación le añadimos al tubo del RM 0,1–0,2 mL del reactivo Rojo de Metilo.

Resultados:

- Si la prueba es POSITIVA aparece coloración roja en la superficie de contacto del reactivo y del medio de cultivo.
- Si la prueba es NEGATIVA se queda el color del medio (amarillo)

Precauciones:

Es importante incubar como mínimo 48 horas. Si se observa un color anaranjado hay que continuar con la incubación hasta 4 días.

Si hacemos la lectura antes de las 48 horas todas las enterobacterias darán la prueba positiva, ya que todas fermentan la glucosa.

Las enterobacterias que van a ser Rojo de Metilo positivas producen como consecuencia del metabolismo de la glucosa unos productos ácidos en gran cantidad y estables. Trascurridas las 48 horas se añade el indicador. En este caso, los ácidos habrán superado el sistema amortiguador del tampón ($\text{pH} = 4 - 4,5$), por el contrario, las enterobacterias que van a ser Rojo de Metilo negativas también producen ácidos pero se producen en menor cantidad, son menos estables, se produce mayor cantidad de CO_2 y, además, se producen productos como consecuencia de la degradación de las peptonas, con lo que el pH tiende a la neutralidad, es decir que tiende a alcalinizarse.

Voges-Proskauer

Principio: Es una prueba que pone de manifiesto un producto final neutro que es la Acetoína.

Técnica: Se inocula y se incuba durante 24 – 48 horas. Para poner de manifiesto la acetoína se utilizan 0,6 mL de –naftol al 5% (intensifica el color) y 0,2 mL de KOH ó NaOH al 40% (oxida la acetoína en diacetoilo, que es el producto coloreado junto con el alcali y las peptonas). Es importante que se añadan en este orden y tienen que ser medidas exactas.

Resultados: Se realiza la lectura a los 10–15 min de la adición de los reactivos:

- Si la prueba es POSITIVA se observa un color rojo rosado en la superficie del medio.
- Si la prueba es NEGATIVA se observa un color amarillo en la superficie del medio

Precauciones:

Después de la incubación del reactivo es importante dejar destapado el tubo con el fin de que el O_2 se ponga en contacto con los productos formados, de tal forma que se acelere la reacción.

En la mayoría de los casos, las enterobacterias que son RM^+ son PV^- y viceversa.

O.N.P.G ortonitrofenol –D–galactopiranósido

Principio: Es una prueba que pone de manifiesto la capacidad de un m.o de fermentar la Lactosa, demostrando la presencia ó ausencia de la enzima –galactosidasa cuando se emplea un compuesto orgánico que es el ONPG. Si en la célula bacteriana se encuentran enzimas para metabolizar la lactosa, el reactivo ONPG es hidrolizado, liberando un compuesto amarillo (ortonitrofenol).

Estas enzimas son inducidas y están controladas genéticamente. Pueden disminuir o desaparecer después de varias generaciones si el sustrato no está presente.

NOTA: las enzimas **inducidas** son aquellas que la bacteria produce exclusivamente cuando se encuentra el sustrato sobre el que se va a ejercer su acción. Las enzimas **constitutivas** son aquellas que son producidas por la bacteria independientemente de que el sustrato se encuentre o no en el medio de cultivo.

Para que se produzca la fermentación de la Lactosa, un microorganismo necesita 2 enzimas:

- – galactosidasa permeasa: Se encuentra en la membrana celular. Transporta la Lactosa al interior celular.
- –D– galactosidasa: Hidroliza la Lactosa en el interior celular.

En función de que la bacteria tenga una, las dos o ninguna de las enzimas, podemos clasificarlas en:

- ♦ **Activas:** Poseen las dos enzimas.
- ♦ **Retardadas:** Carecen de la α -galactosidasa permeasa y poseen la β -D-galactosidasa. Tardan más tiempo en degradar la Lactosa porque tienen que producir la permeasa.
- ♦ **No fermentadores:** No poseen ninguna de las enzimas.

Técnica: Es necesario partir de un cultivo puro, reciente, preferiblemente obtenido a partir de un medio de cultivo de Kligler. Tomaremos una cantidad espesa de inóculo para demostrar rápidamente la presencia de la enzima.

A partir del cultivo preparamos una suspensión del microorganismo en un tubo de hemólisis con 0,5 mL de agua destilada. Ponemos un disco de ONPG en el tubo y lo incubamos a 37°C.

Resultados:

- Si la prueba es POSITIVA: en los 15–30 minutos posteriores a la adición del disco, el medio se habrá vuelto amarillo.
- Si la prueba es NEGATIVA: habrá que esperar entre 2,3 o incluso 24 horas para una buena confirmación. El medio no cambiará de color.

Prueba de las Descarboxilasas

Principio: Con esta prueba ponemos de manifiesto la capacidad que tiene un microorganismo, mediante la enzima correspondiente, para decarboxilar un aminoácido (Lisina, Arginina, Ornitina). Son enzimas inducidas y, generalmente, estas reacciones se producen en condiciones anaerobias. Son capaces de actuar sobre distintos aminoácidos, la enzima ataca al grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y da lugar a una amina y a CO_2 .

Nosotros sólo realizaremos la prueba de la Lisina Carboxilasa. Si esta enzima se encuentra presente se formará Cadaverina y CO_2 (alcaliniza).

Dependiendo del medio de cultivo que se utilice, una vez inoculado, es necesario sellarlo para obtener las condiciones anaerobias. En este caso del caldo de Lisina no es necesario sellarlo, basta un tapón metálico, preferiblemente de rosca.

Técnica: Inoculamos el medio de cultivo (caldo) con un inóculo escaso y lo incubamos durante 24 horas a 37°C. En algunos casos es necesario incubar hasta 4 días.

Resultados: El medio sin inocular es de color púrpura y suele contener glucosa y el aminoácido que queremos estudiar.

- Si la prueba es POSITIVA: el medio tomará un color púrpura amarillento o púrpura turbio. Primero habrá pasado por el color amarillo y luego habrá revirado al púrpura.
- Si la prueba es NEGATIVA: el medio tomará un color amarillo brillante. Solo se consume la glucosa.

Precauciones: Es conveniente guardar un tubo sin inocular con el fin de comprobar los resultados.

Prueba de la Ureasa

Principio: Con esta prueba ponemos de manifiesto la capacidad orgánica de algunas bacterias de desdoblar la urea en dos moléculas de amoníaco, mediante la acción de la enzima Ureasa, que es una enzima constitutiva.

Técnica: Se pueden utilizar distintos medios de cultivo:

- **Agar base de urea:** tiene el inconveniente que hay que prepararlo, esterilizarlo y, antes de que se enfríe, hay que añadirle la urea. Se usa de forma inclinada.
- **Caldo de urea:** ya lleva incorporada la urea. Directamente se siembra el microorganismo y se incuba.

Resultados: Se observa a las 24 o incluso a las 48 horas.

- ♦ Si la prueba es POSITIVA: el medio se observará de un color rosado
- ♦ Si la prueba es NEGATIVA: no se producirá ningún cambio de color. Se mantendrá el color amarillo-anaranjado del medio inicial.

Prueba de la Fenilalanina Desaminasa

Principio: La prueba pone de manifiesto la capacidad enzimática de un microorganismo para desaminar la fenilalanina, originándose el ácido fenilpirúvico.

Técnica: Se utiliza el medio fenilalanina en tubo inclinado. Se siembra un inóculo denso, reciente, puro y se incuba durante 24 horas.

Resultados: Para poner de manifiesto el producto coloreado se añade Cloruro Férrico al 10% : Ác. Fenilpirúvico + Cloruro Férrico ! COLOR

Dejamos resbalar por la superficie del agar inclinado 5-6 gotas del reactivo y se mueve el tubo suavemente para extenderlo.

- Si la prueba es POSITIVA: aparece un color verde sobre la superficie.
- Si la prueba es NEGATIVA: se queda del color del Cloruro Férrico, es decir, amarillo.

SISTEMAS COMERCIALES DE IDENTIFICACIÓN (Fotocopias)

API 10 S: La galería API 10 S consta de 10 microtúbulos que contienen sustratos deshidratados. Estos test se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los medios. Durante la incubación, se producen cambios de color espontáneos o revelados por adición de reactivos. Después de la incubación de 18-24 horas a 35-37°C, la lectura de reacciones se realiza visualmente con la Tabla de Lectura y la identificación se alcanza consultando la lista de perfiles de la ficha técnica o con un software de identificación.

Técnica:

- Preparación de la galería: Repartir aproximadamente 3 mL de agua destilada en los alveolos del fondo de la cámara de incubación con el fin de crear una atmósfera húmeda. Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara
- Preparación del Inóculo: Preparar una suspensión de una colonia del m.o con 5mL de solución fisiológica al 0,85%.
- Inoculación de la galería:
 - Llenar el tubo y la cúpula del test $\emptyset$ CIT $\emptyset$ con la suspensión bacteriana.
 - Llenar solo los tubos (y no las cúpulas) de los otros test.
 - Crear una anaerobiosis en los test LDC, ODC, H₂S, URE, llenando su cúpula con aceite de parafina.
 - Cerrar la cámara de incubación
 - Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.
 - Lectura de la galería: se utiliza la Tabla de Lectura. Anotar las reacciones espontáneas en la hoja de

resultados y luego leer los test que requieren añadir reactivos:

- ◆ Test TDA: añadir 1 gota de cloruro Férrico. Una coloración marrón-rojiza indica una reacción positiva.
- ◆ Test IND: añadir 1 gota de reactivo de Kovacs. Si la reacción es positiva aparecerá una coloración rosa.
- ◆ Test NO₂: añadir 1 gota de reactivos NIT1 y NIT2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva.
- Identificación: se realiza mediante un perfil numérico. En la hoja de resultados, los test están separados en grupos de tres y un valor 1, 2 ó 4 se indica para cada uno. Dado que la galería API 10 S consta de 1º test, al sumar los valores dentro de cada grupo que corresponden a las reacciones positivas, se obtienen 4 cifras que corresponden al perfil numérico.

Enterotube: Se utiliza para la identificación de Enterobacteriaceae.

Técnica:

- Quitar los capuchones de protección roscados. Bajo el capuchón blanco se encuentra la punta de la aguja de inoculación. Con la punta de la aguja sin flamear se pica ahora cuidadosamente una colonia bien aislada, sin atravesar el agar.
- Extraer la aguja por todos los compartimentos, haciéndola girar ligeramente. Seguidamente se introduce de nuevo la aguja hasta que la muesca de la aguja alcance la abertura del tubo. La punta de la aguja debe llegar hasta el compartimento de citrato.
- Romper la aguja, doblándola hacia un lado, por la muesca. Con el extremo restante de la aguja rota se perfora ahora la película plástica que recubre los orificios de aireación de los últimos 8 compartimentos para así permitir en estos un crecimiento en aerobiosis. A continuación, enroscar de nuevo los capuchones.
- Incubar en posición vertical, con el compartimento de glucosa hacia arriba, o bien en posición horizontal, con la película de plástico hacia abajo a una temperatura de entre 35–37°C durante 20–24 horas.
- Después de la incubación se registran, en una ficha de interpretación, las reacciones positivas, a excepción de los compartimentos del Indol y VP, ya que necesitan la adición de reactivos. Para la prueba del Indol añadir con una jeringa 3 ó 4 gotas de reactivo de Kovacs, atravesando la superficie de plástico por arriba del compartimento de H₂S / Indol. Será positivo si el reactivo agregado adquiere un color rojo en pocos segundos. Para la prueba de VP inyectar 3 gotas de solución –naftol y 2 gotas de KOH por el orificio de aireación lateral en el compartimento de VP con el Enterotube en posición horizontal. Será positivo si el reactivo agregado adquiere un color rojo dentro de los 10 minutos siguientes.

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA

Se utiliza fundamentalmente para la identificación del género Salmonella, Shigella y E.coli.

Se basa en la utilización de pruebas de aglutinación mediante la identificación de al menos tres antígenos. Estos antígenos son:

- ◆ **Ag somático 0:** Lo suelen poseer cepas como:
 - E.coli 0112: es una cepa enteroinvasiva que produce un cuadro de diarrea similar a la originada por Shigella.
 - E.coli 0157: produce una neurotoxina que da lugar a una colitis hemorrágica y al síndrome urémico hemolítico.
 - Shigella: permite clasificar en cuatro grupos diferentes la identificación de este Ag somático 0.

- ♦ **Ag capsular K:** Está constituido por polisacáridos de la cápsula. Es termolábil. Suele estar presente en los géneros Klebsiella, Salmonella (algunas cepas pueden presentar un Ag Vi que está relacionado con la mayor virulencia de las mismas) y E.coli.
- ♦ **Ag flagelar H:** Está formado por proteína. Son termolábiles.

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

◊ PATOLOGÍAS

ENTEROBACTERIAS ASOCIADAS CON INFECCIONES GASTROINTESTINALES Y FIEBRE ENTÉRICA

Escherichia coli: Es una bacteria que se asocia con 4 tipos distintos de infección entérica:

- ♦ E.coli enterotoxigénica (ETEC)

Esta es la que se asocia en mayor grado con las diarreas infantiles en los países subdesarrollados y es causante también de la diarrea del viajero. Generalmente, este tipo de diarreas se produce como consecuencia de la ingestión de agua y alimentos contaminados. Para que se produzca el cuadro diarreico es necesario que se ingiera una elevada cantidad de m.o ya que estos no suelen resistir la acción de pH ácido del estómago.

El m.o coloniza el intestino delgado favoreciendo la adhesión mediante las fimbrias que posee, además produce 2 tipos de toxinas: una termolábil y otra termoestable. Estas toxinas inducen una secreción activa de metabolitos a la luz intestinal y el cuadro clínico se manifiesta como diarrea acuosa, náuseas, dolor abdominal y fiebre.

- ♦ E.coli enteroinvasiva (EIEC)

Estas cepas de E.coli dan lugar a un cuadro similar a la Shigellosis. Son capaces de invadir y multiplicarse en las células epiteliales de la mucosa intestinal, produce fiebre, dolor abdominal y diarrea acuosa con eliminación de sangre y moco. En ocasiones puede producir un cuadro de toxemia.

- ♦ E.coli enteropatógena (EPC)

Estas cepas de E.coli pueden dañar la mucosa intestinal originando descamación de la misma. Algunas cepas producen toxinas que tienen una acción citotóxica.

El cuadro clínico se presenta con diarrea, eliminación de moco y apenas presencia de sangre. Suelen afectar con mayor frecuencia a los lactantes y a niños de corta edad.

- ♦ E.coli 0157: H7

Suele producir dos cuadros clínicos:

- ♦ Colitis hemorrágica. Es una forma grave de diarrea.
- ♦ Síndrome urémico hemolítico. Se produce una insuficiencia renal, anemia hemolítica y trombocitopenia.

Salmonella: Produce gastroenteritis transmitidas generalmente por el consumo de alimentos contaminados por el m.o. Es móvil.

El reservorio de la Salmonella suele ser los animales, excepto la Salmonella typhi cuyo reservorio es el hombre.

Los puentes de las infecciones por Salmonella suelen ser las aves y sus productos, y con menor frecuencia, leche y sus derivados.

Para que se produzcan los cuadros de gastroenteritis es necesaria la ingestión de un gran número de

m.o ya que la acidez gástrica disminuye el número de m.o viables. Aquellos que sobreviven a la acidez gástrica pasan al intestino delgado donde se multiplican. Esta proliferación del m.o en el intestino puede cursar sin sintomatología clínica o de forma sintomática. En éste último caso, se puede manifestar como enterocolitis, bacteriemia o fiebre entérica:

- ♦ **Fiebre Entérica:** El cuadro de esta fiebre suele estar producido por *S. typhi* o por *S. paratyphi*.

Da lugar a lo que se conoce como fiebres tifoideas o paratifoideas.

Una vez que se produce la ingestión de estas salmonellas y llegan al intestino delgado, pueden atravesar el sistema linfático y alcanzar el torrente circulatorio produciéndose la diseminación a otros órganos.

- ♦ **Bacteriemia:** Suele estar producida por *S. cholerae*, *S. suis* y otros tipos de *Salmonella*.
- ♦ **Enterocolitis:** Suelen estar causadas por *S. typhimurium* que es la forma más común de manifestarse las infecciones por *Salmonella*.

Este tipo de infecciones producidas por *S. typhimurium*, después de transcurridas de 8 a 48 horas de la ingestión de alimentos contaminados se produce un cuadro de náuseas, vómitos y diarrea. La que más importancia tiene en el cuadro clínico de las *Salmonellas* es la Enterocolitis, porque se produce por la ingestión de alimentos. No citan tratamiento antibiótico.

Shigella: Son una de las causas más frecuentes de diarrea bacteriana. La diarrea producida por *Shigella* también se conoce como disentería bacilar.

La vía de transmisión de este microorganismo es la vía fecal-oral y también a través de los alimentos contaminados con heces. Resiste la acidez gástrica, por lo que es suficiente un pequeño número de m.o para producir la infección. Se multiplica en la mucosa intestinal aunque sin llegar a atravesarla, por este motivo, los hemocultivos serán negativos.

- ♦ *Shigella dysenteriae* tipo I

Elabora una toxina termolábil que es neurotóxica y citotóxica. Produce una diarrea similar a la enterotoxina termolábil de *E. coli*. El carácter neurotóxico de la toxina determina que, en ocasiones, se puedan producir cuadros de meningitis y coma. Generalmente, los niños de corta edad son los más afectados por este tipo de infección.

Yersinia: Dentro de este género, la *Yersinia enterocolitica*, da lugar a cuadros de gastroenteritis por ingestión de agua o alimentos contaminados. Con menor frecuencia, también se produce la infección por contacto directo con animales infectados. Este m.o es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, por lo que es un m.o a tener en cuenta en la industria alimentaria. Para que se produzca la infección es necesario que el sujeto ingiera gran cantidad de inóculo.

Con menor frecuencia se aíslan también *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia intermedia*, que también originan cuadros de gastroenteritis.

ENTEROBACTERIAS ASOCIADAS CON INFECCIONES EXTRAINTESTINALES

Yersinia pestis: Es el agente etiológico de la peste bubónica. Se transmite por la picadura de la pulga o por manipulación de animales infectados. El principal reservorio lo constituyen las ratas.

Una vez que el m.o penetra a través de la piel, como consecuencia de la picadura, es fagocitado por macrófagos y leucocitos en cuyo interior se multiplican. Durante esta fase intercelular el m.o sintetiza dos Ag, uno proteico y otro lipoproteico, que permiten que el m.o no sea destruido por las células inmunitarias una vez que se produce la lisis de la célula que parasita.

Las infecciones por *Yersinia pestis* se pueden manifestar como peste bubónica, peste sistémica o peste neumónica.

En la peste bubónica hay una infección de los ganglios linfáticos con inflamación, pudiendo producirse cuadros de neumonía por diseminación hematógena. La peste sistémica se caracteriza por fiebre y bacteriemia. La peste neumónica es muy contagiosa por vía aérea.

E.coli: Es la principal causa de infecciones del tracto urinario. Pueden dar lugar a cuadros de cistitis, uretritis, pielonefritis y sepsis.

Las cepas implicadas en este tipo de infecciones son las denominadas Urohepatogénicas, debido a que poseen elementos de adherencia entre otros factores de patogenicidad.

El *E.coli* también produce infecciones de tipo nosocomial, entre las que se encuentran neumonías e infecciones de heridas quirúrgicas.

Además puede producir meningitis neonatal, que está producida por una cepa con Ag capsular denominada K1.

Klebsiella-Enterobacter-Serratia: Este grupo de enterobacterias da lugar a infecciones de origen nosocomial.

- ◆ *Klebsiella pneumoniae*. Es el agente etiológico de aproximadamente el 3% de las neumonías de origen bacteriano. Suele afectar a individuos con diabetes, alcoholismo o infecciones pulmonares. (inmóvil)
- ◆ El género *Enterobacter* engloba patógenos oportunistas que producen principalmente infecciones de heridas, quemaduras e infecciones de tracto respiratorio y urinario.
- ◆ *Serratia* es un género formado por especies habitualmente saprofitas del suelo que pueden producir infecciones nosocomiales, principalmente del tracto respiratorio y urinario.

Proteus-Morganella-Providencia: Estos géneros se suelen relacionar con infecciones del tracto urinario. La capacidad que tienen para hidrolizar la orina produce la liberación de amoníaco, lo que determina una alcalinización de la misma que induce a la formación de cálculos. Por otro lado, la movilidad del género *Proteus* favorece la invasividad del tracto urinario por parte de esta enterobacteria. El género *Providencia* se ha asociado a bacteriemias en pacientes con catéteres venosos.

Citrobacter: Esta bacteria se engloba dentro del género de patógenos oportunistas. Se asocia con infecciones urinarias y respiratorias en pacientes hospitalizados. (móvil).

El *Citrobacter diversus* se asocia en casos de meningitis en neonatos.

FAMILIA II: VIBRIONACEAE

Son Bacilos Gram⁻, anaerobios facultativos.

Podemos distinguir cuatro géneros:

Género I: VIBRIO

Género II: PHOTOBACTERIUM

Género III: AEROMONAS

Género IV: PLESIOMONAS

GÉNERO I: VIBRIO

Son bacilos Gram–, anaerobios facultativos, móviles (flagelo polar), Oxidasa+, reducen los nitratos a nitritos, todos los miembros de este género son capaces de crecer en medios que contienen sal (halofílicos).

El género Vibrio está ampliamente distribuido en la naturaleza. Son bacterias acuáticas. Ciertas especies de Vibrios producen infecciones localizadas y otras especies pueden dar lugar también a infecciones sistémicas.

◇ ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Poseen el **antígeno flagelar H**, que es termolábil y el **antígeno somático O**, que es termoestable, de naturaleza polisacárida, específicos y que se utilizan para la serotipificación.

Vibrio cholerae 01

Son los que producen las epidemias de cólera. Estas cepas epidémicas de V.cholerae se pueden separar según factores específicos en los serotipos: Ogawa ; Inaba y Hikojima. Además de estos serotipos, se conocen también dos biotipos de V.cholerae 01 que son el Clásico y El Tor.

◇ TOXINAS

El V.cholerae produce una potente enterotoxina que provoca un aumento de la secreción de agua y electrolitos a la luz intestinal.

El biotipo El Tor de V.cholerae produce hemolisinas que son termolábiles y tienen una actividad citotóxica.

Otras especies de Vibrios producen toxinas extracelulares con actividad citolítica y citotóxica.

◇ AISLAMIENTO

◆ Transporte de las muestras:

Para aquellas muestras que son extraintestinales, el procesamiento de las mismas se realiza de igual manera que para el aislamiento de otras bacterias.

Cuando la muestra son heces, y no se van a procesar inmediatamente después de su recogida, es necesario utilizar un medio de transporte (Ej. Cary–Blair) con el fin de evitar la exposición al aire de la muestra, ya que los Vibrios son muy sensibles a la desecación.

◆ Medios de cultivo: Los Vibrios se desarrollan bien en:

◇ Agar sangre: los Vibrios desarrollan colonias con o sin hemólisis, Oxidasa+.

◇ Agar MacConkey: dan lugar a colonias incoloras, Lactosa–.

Cuando se sospecha una infección entérica por V.cholerae es necesario incluir una placa de un medio selectivo : Agar TCBS (Tryptosa, Citrato, Bilis, Sacarosa). En este medio, los Vibrios que son fermentadores de sacarosa producen colonias amarillas, mientras que los no fermentadores dan lugar a colonias verde azuladas.

Cuando es necesario utilizar caldos de enriquecimiento para el aislamiento, a partir de las heces, es conveniente utilizar Agua de Peptona alcalina con un 1% de Cloruro Sódico.

◇ IDENTIFICACIÓN

- Tinción de Gram: son bacilos Gram–, cortos, rectos o curvados.
- Pruebas bioquímicas: se utilizan los medios habituales para la identificación de enterobacterias, siempre y cuando estén enriquecidos con Cloruro Sódico.

◊ **PATOLOGÍA**

- ◆ **Vibrio cholerae 01:** Es el agente etiológico del Cólera. Tiene 2 biotipos el Clásico y El Tor.

El biotipo El Tor causa infecciones menos graves que el biotipo Clásico. La infección se adquiere por vía oral, se necesita una dosis de m.o alta y, una vez que han superado la mucosa gástrica, los Vibrios se fijan en las células epiteliales del intestino delgado donde elaboran la enterotoxina.

Los síntomas clínicos son náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea acuosa. Las deposiciones son continuas, lo que conduce a una pérdida masiva de agua y electrolitos.

El tratamiento es fundamentalmente sintomático y consiste en la reposición de líquidos y electrolitos.

- ◆ **Vibrio cholerae NO 01:** También producen cuadros de gastroenteritis, aunque más leves que el cólera y, en ocasiones también se aíslan en infecciones extraintestinales:
 - ◊ *Vibrio vulnificus*: es el más patogénico.
 - ◊ *Vibrio parahaemolyticus*: es junto con el *V.cholerae* el m.o que con más frecuencia se aísla en clínica. Se asocia con infecciones gastrointestinales por consumo de pescado crudo.

◊ **EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL**

Los factores de riesgo para la adquisición de infecciones por especies de Vibrios no coléricos son el consumo de pescado y mariscos crudos o poco cocinados y el contacto con heridas y mucosas con aguas contaminadas.

Por lo que respecta al Cólera, la diseminación del mismo se produce por contacto de persona a persona y por el consumo de alimentos y aguas contaminadas.

El control de las infecciones producidas por los Vibrios consiste en la educación sanitaria y en la mejora de las condiciones higiénico–sanitarias.

GÉNERO III: AEROMONAS

Son bacilos Gram–, anaerobios facultativos, Oxidasa+, fermentan la Glucosa con o sin producción de gas, son móviles (flagelo polar), capaces de crecer en un amplio intervalo de temperaturas.

Se diferencian de los Vibrios porque no crecen en concentraciones al 6,5% de Cloruro Sódico. Habitan aguas dulces y saladas, donde infectan a los peces y, en el hombre, se asocian a infecciones gastrointestinales.

◆ **PATOLOGÍA**

Consiste en diarrea aguda (infección más frecuente producida por este tipo de microorganismo que se asocia a la diarrea del viajero). Con menos frecuencia puede dar lugar a celulitis e infecciones de heridas por contacto con agua o tierra contaminada.

GÉNERO IV: PLESIOMONAS

Este género comprende una única especie, *P.shigelloides*, que produce Catalasa y Oxidasa, fermenta

la Glucosa sin producción de gas, es capaz de crecer en un amplio margen de temperaturas siendo la óptima 37°C.

Generalmente habita en el intestino de peces de agua dulce y animales. Se asocia con infecciones intestinales en áreas tropicales y subtropicales.

♦ **MEDIOS DE CULTIVO. AISLAMIENTO**

Se desarrollan en agar sangre y también en Agar Salmonella–Shigella.

Se distingue de las Enterobacterias por la prueba de la Oxidasa.

Se distingue de las Aeromonas por la prueba de la Dnasa (Aeromonas son +)

Se distingue de los Vibrios en que no toleran la sal (Vibrios sí).

FAMILIA III: PASTEURELLACEAE

Genero I: PASTEURELLA

Género II: HAEMOPHILUS

Género III: ACTINOBACILLUS

GÉNERO I: PASTEURELLA

El m.o más significativo de esta familia es la P.multocida. Los m.o de este género forman parte de la flora respiratoria y gastrointestinal de muchos animales domésticos. El hombre se infecta con esta bacteria por contacto directo, generalmente tras la mordedura de animales.

Este m.o crece bien en Agar Sangre, por lo que su aislamiento no resulta complicado. Las colonias en Agar Sangre son pequeñas, translúcidas y suelen despedir un olor típico a champiñón. Son Oxidasa, Catalasa, Indol y Nitrato positivas, fermentan la Glucosa.

GÉNERO II: HAEMOPHILUS

Son bacterias inmóviles y no esporuladas que pueden presentar una morfología coco–bacilar o filamentosa. Algunas especies poseen cápsula de naturaleza polisacárida, lo que se considera un factor de patogenicidad.

Son parásitos del tracto respiratorio superior del hombre y de los animales, llegando a constituir un 10% de la flora permanente de la orofaringe de los individuos sanos.

Fermenta los carbohidratos con producción de ácidos, reducen los nitratos y la mayor parte son Oxidasa y Catalasa positivos.

Para su crecimiento requieren, en los medios de cultivo, la presencia de los factores V y X de la sangre. El factor V no se encuentra libre en la sangre y, para liberarlo, deben romperse las células sanguíneas mediante calentamiento. Las placas deben incubarse a una temperatura de entre 35–37°C, en atmósfera húmeda y con una concentración de CO₂ entre el 5–10%.

♦ **IDENTIFICACIÓN**

- ♦ Se puede identificar, demostrando la dependencia de estas bacterias de los factores V y X ó

ambos para crecer. Esta dependencia se detecta por la observación de crecimiento macroscópico en satélite alrededor de un disco que contiene cada uno de estos factores en un medio carente de los mismos, como es el Agar Mueller–Hinton.

Este satelitismo se puede poner también de manifiesto en un medio de Agar Sangre en el que se siembra en estría una *Pseudomona* o un *Stafilococo*. Los *Haemofilus* dependientes del factor V crecen alrededor de estas bacterias que fabrican este factor y no crecen en el resto de la placa.

◆ Mediante Pruebas Bioquímicas:

- ◇ Fermentación de Carbohidratos
- ◇ Prueba de la Catalasa
- ◇ Indol
- ◇ Prueba de la Ureasa
- ◇ ONPG

◆ Mediante Pruebas Serológicas: únicamente tienen valor para la identificación de las células capsuladas de *Haemofilus influenzae*, el cual se puede clasificar en 6 serotipos que se designan con letras que van desde la A hasta la F. El método más sencillo, cuando este m.o está en un cultivo, es la aglutinación en porta.

• **PATOLOGÍA**

◆ *Haemofilus influenzae*

Parasita exclusivamente al hombre, localizándose en el tracto respiratorio superior. Requiere de los factores V y X para su crecimiento y, en Agar Chocolate, las colonias son transparentes.

Accede a las vías respiratorias superiores por inhalación, coloniza las mucosas y se ha encontrado que hasta un 80% de las personas pueden ser portadoras sin desarrollar síntomas clínicos.

Estas cepas suelen ser, en general, no capsuladas, siendo el más frecuente *H.influenzae* serotipo B. Puede llegar al torrente circulatorio alcanzando las meninges o localizarse en las articulaciones y producir artritis séptica.

◇ *Haemofilus ducreyi*

Es el agente etiológico del chancro blando o chancroide, que es una enfermedad venérea caracterizada por la presencia de úlceras en los genitales y en la zona perianal. El período de incubación es de 7 días desde que se produce el contacto.

Las muestras para el cultivo deben tomarse en la base de la úlcera y el aislamiento de *H.ducreyi* es definitivo para establecer el diagnóstico de esta patología.

◇ Otras especies: grado de patogenicidad muy inferior a *H.influenzae*.

- *H.parainfluenzae*
- *H.parahemolitycus*

Suelen producir cuadros similares al *H.influenzae*: otitis,

sinusitis, epiglotitis, etc.

Dentro del género bacilus, todos los Haemophilus que se designan con el prefijo para- solo requieren para su crecimiento el factor V.

Factores de patogenicidad:

- ◊ Cápsulas
- ◊ Proteasas IgA: impiden o inhiben la acción de las inmunoglobulinas IgA que se encuentran generalmente en las mucosas.
- ◊ Fimbrias o pili: permiten la adhesión a determinadas superficies.
- ◊ Membrana externa (Gram-): la parte patogénica está constituida por las proteínas y los polisacáridos.

GÉNERO III: ACTINOBACILLUS

Suelen ser parte de la flora habitual normal de gran número de animales y la infección se produce por la inoculación de estas bacterias, generalmente, por mordeduras.

2.5 SECCIÓN 9. RICKETTSIAS Y CLAMIDIAS

ORDEN I: RICKETTSIALES

FAMILIA I: RICKETTSIACEAE

TRIBU I: RICKETTSIEAE

- ◆ RICKETTSIA
- ◆ ROCHALIMAEA
- ◆ COXIELLA

RICKETTSIAS

Son un grupo de bacterias que son parásitos intracelulares obligados y cuyo ciclo vital transcurre en parte o en su totalidad en un artrópodo que es el vector, siendo el hombre un huésped accidental en el ciclo biológico de las Rickettsias.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO (Común para las Rickettsias en general, independientemente de que la produzcan Rickettsia, Coxiella, Ferlichia,...)

Como son parásitos intracelulares obligados, no se pueden utilizar medios de cultivo. Hay que utilizar medios celulares vivos, como animales, embrión de pollo o cultivos celulares. Estos últimos son los más utilizados en el laboratorio.

Además del cultivo en medios celulares vivos, la base para

determinar el diagnóstico es el diagnóstico serológico:

- ◇ Microaglutinación
- ◇ ELISA
- ◇ Hemaglutinación indirecta
- ◇ Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): es una técnica que permite la detección precoz de IgM, por lo que nos va a permitir diferenciar entre una infección reciente y el estado del portador en el cual, las inmunoglobulinas que estarían elevadas serían las de la clase IgG.
- ◇ Técnica de Fijación del Complemento (FC): se utiliza exclusivamente para el diagnóstico de la Fiebre Q. En este caso, los Ag que se utilizan son Ag que se obtienen a partir de suspensiones de Coxiella en Fase I ó en Fase II.
- ◇ Inmunofluorescencia Directa (IFD): es la más utilizada. Se utiliza para demostrar la presencia de Rickettsias en tejidos infectados y garrapatas.

En la práctica, todas estas técnicas tienen el problema de que se utilizan tardíamente y de que su confirmación requiere esperar una seroconversión o un aumento 4 veces del título, hecho que ocurre entre la 3ª y la 4ª semana.

ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR RICKETTSIAS

ENFERMEDAD	AGENTE	TRANSMISIÓN
Fiebre	R. conori	Garrapata
Tifus Epidémico	R. prowazekki	Piojo
Fiebre Montañas Rocosas	R. rickettsi	Garrapata
Fiebre Matorrales	R. tsutsugamushi	Ácaros
Tifus Murino	R. typhi	Pulga
Fiebre Q	Coxiella burnetti	Aerosoles
Fiebre de las Trincheras	Rochalimaea quintana	Piojo

Completar las enfermedades con las fotocopias.

ORDEN II: CHLAMYDIALES

FAMILIA: CHLAMYDIACEAE

GÉNERO: CHLAMYDIA

ESPECIE: C. PSITACCI / C. TRACHOMATIS / C. PNEUMONIAE / C. PECORUM

CHLAMYDIAS

Las Chlamydias son Bacilos Gram–, inmóviles. Son patógenos intracelulares y con un ciclo vital particular que las diferencia del resto de las bacterias. Es un parásito del hombre y los animales y produce infecciones crónicas y persistentes.

CICLO DE MULTIPLICACIÓN

Durante el ciclo de multiplicación se produce la alternancia de dos tipos de células:

- ◇ **Cuerpos Elementales:** son la forma infectiva. De pequeño tamaño. Viven en medio externo, es decir, fuera de la célula.
- ◇ **Cuerpos Reticulados:** Son metabólicamente activos y de mayor tamaño que los anteriores. Constituyen la forma no infectiva que vive dentro de las células.

El ciclo de multiplicación de Chlamydias se inicia por la adherencia de los cuerpos elementales a las células susceptibles de infectarse. Una vez en el interior de la célula, el cuerpo elemental sufre una reorganización dando lugar a un cuerpo reticulado. Estos se dividen repetidamente por fisión binaria transformándose en cuerpos elementales. La célula muere y se liberan al exterior nuevos cuerpos elementales que infectarán otras células. Por lo tanto, para que se produzca la infección, será necesario que en la mucosa, ya sea respiratoria, ocular o genital, se produzca la unión del cuerpo elemental a las células, que este cuerpo elemental induzca la fagocitosis, impida la fusión del lisosoma y se produzca el ciclo de multiplicación de Chlamydia.

NOTA: Fases en las que se desarrolla la Fagocitosis:

- ◇ La fagocitosis es producida por las células fagocitarias (neutrófilos y monocitos. Los monocitos dan lugar a los macrófagos, y, estos a su vez, pueden ser ambulantes o histiocitos, que son fijos).
- ◇ Quimiotaxis
- ◇ Adhesión: la membrana citoplasmática del fagocito se une a la superficie del microorganismo.
- ◇ Ingestión: se forma una bolsa llamada fagosoma o vacuola fagocitaria.
- ◇ Digestión: ese fagosoma se separa de la membrana y penetra en el citoplasma, entra en contacto con los lisosomas y se produce la fusión del fagosoma con el lisosoma dando lugar a una vacuola digestiva o fagolisosoma.

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Los Ag que poseen las Chlamydias se pueden diferenciar en:

- ◊ Ag de género: residen en el LPS (lipopolisacárido) de la membrana externa de los cuerpos elementales y cuerpos reticulados.
- ◊ Ag específicos de especie y de tipo: son proteínas asociadas a la membrana.

DIAGNÓSTICO

Generalmente, las muestras que se necesitan para el diagnóstico de Chlamydias deben procesarse entre las 24–48 horas siguientes a la toma y se conservarán a 4°C. Si sobrepasan las 48 horas será necesario congelarlas.

Las muestras serán respiratorias (aspirados), oculares (exudados o raspados conjuntivales) ó genitales (torundas)

Se puede intentar diagnosticar aislando el microorganismo. Como son m.o intracelulares obligados, se utilizan medios celulares vivos (cultivos celulares).

Detección de Ag: IFD y ELISA

Métodos Serológicos: Detectan los Ac que se producen en una infección por Chlamydia:

- ◊ Técnica de Fijación del Complemento (FC): se utiliza como Ag el LPS y pone de manifiesto inmunoglobulinas del tipo IgM e IgG.
- ◊ Microinmunofluorescencia Indirecta (MIF): los Ag utilizados son Ag que se obtienen a partir de los cuerpos elementales
- ◊ ELISA

INFECCIONES CAUSADAS POR CHLAMYDIAS

- Transmitidas por contacto Directo ó Fómites:
 - Infecciones oculares y genitales ! C. trachomatis
 - Infecciones oculares ! C. pneumoniae
- Transmitidas por vía respiratoria: C. psittaci / C. pneumoniae

Infecciones producidas por Chlamydia trachomatis

- ◊ Infecciones genitales en el varón: uretritis (30–60% no gonocócicas ! secreción uretral mucosa y disuria), epididimitis, prostatitis, proctitis,...
- ◊ Infecciones genitales en la mujer: infección cervical (exudado mucoso y disuria), síndrome uretral agudo, enfermedad pélvica inflamatoria (término colectivo que engloba cualquier infección bacteriana que afecte al útero, trompas de Falopio ! salpingitis, y ovarios).

- ◊ Infección neonatal: se produce como consecuencia de la contaminación del recién nacido en el canal del parto (infecciones oculares)
- ◊ Linfogranuloma venéreo: inflamación de los ganglios linfáticos próximos a la infección. En ocasiones evoluciona hacia una cicatrización de los vasos linfáticos que da lugar a un engrosamiento y aumento del tamaño en los genitales, en el caso del hombre y, en la mujer, se manifiesta con una compresión del recto.
- ◊ Infecciones oculares:
 - Tracoma: es la causa más frecuente de ceguera en muchos países subdesarrollados. La ceguera se produce como consecuencia de infecciones repetidas por Chlamydias en la conjuntiva que producen pequeñas abrasiones.
 - Conjuntivitis de inclusión: produce consecuencias más benignas que el Tracoma.

Infecciones producidas por Chlamydia pneumoniae

Es uno de los patógenos comunes del hombre y es el responsable de un importante número de enfermedades respiratorias. Se le reconoce como el responsable del 10% de las neumonías extrahospitalarias; de un 4% de las bronquitis; 5% de las sinusitis;..., también está implicada en una serie de procesos crónicos como enfermedades asmáticas y enfermedades cardiovasculares.

Diagnóstico a partir de un cultivo (líneas celulares)

- ◊ Detección de Ag Directos
 - IFD en muestras clínicas
 - Ac monoclonales que detectan Chlamydia pneumoniae en cultivos celulares.
 - Sondas de ADN (técnica de la PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- ◊ Diagnóstico Indirecto: Métodos serológicos mediante la detección de Ac por MIF (IgG, IgM, IgA).

Infecciones producidas por Chlamydia psittaci

Produce un grupo de enfermedades denominadas Psitacosis y cuyo reservorio son los loros y periquitos domésticos. Cuando las enfermedades están producidas por otro tipo de aves se denominan Ornitis.

Normalmente, C. psittaci produce una forma de neumonía que se acompaña de fiebre, cefaleas y, en ocasiones, con escalofríos. No suele transmitirse de un ser humano a otro, sino que se disemina por contacto con las heces de aves

enfermas. Lo más corriente es la inhalación de partículas desecadas de excrementos.

2.6 SECCIÓN 10: MICOPLASMAS

ORDEN I: MYCOPLASMATALES

FAMILIA I: MYCOPLASMATACEAE

GÉNEROS:

I. MYCOPLASMA

II. UREAPLASMA

GÉNERO I: MYCOPLASMA

La mayoría de los Micoplasmas que pueden aislarse en el hombre se encuentran como saprofitos, orofaríngeos ó urogenitales, sin producir patología. Tan solo M. pneumoniae produce patología en el tracto respiratorio y M. hominis y Ureaplasma urealyticum producen patología en el tracto urogenital.

Los Mycoplasmas son los procariotas de estructura más simple capaces de reproducirse extracelularmente. Son incapaces de sintetizar peptidoglucano (carecen de pared celular), por lo tanto, son bacterias pleomórficas (morfología variable). Es característico de los Micoplasmas que aparezcan formando filamentos similares a los de los hombres.

Poseen una membrana plasmática constituida por fosfolípidos y, en la familia de las Mycoplasmataceae, constituidas también por esteroides, principalmente por colesterol.

Se multiplican por fisión binaria. Los Micoplasmas in vitro son muy exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas y a las condiciones ambientales de crecimiento.

La mayor parte de los Micoplasmas son anaerobios facultativos aunque para su aislamiento primario es recomendable la incubación en una atmósfera de anaerobiosis estricta.

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Es el agente etiológico de la **Neumonía Atípica Primaria**: enfermedad endémica que es causa bastante común de

neumonías en niños y personas jóvenes. Se transmite por vía aérea a través de las gotas de saliva y contactos repetidos. Puede producir infección en cualquier zona de tracto respiratorio, aunque son más frecuentes las infecciones de vías altas. En ocasiones, acompañando a las manifestaciones respiratorias, pueden aparecer manifestaciones cutáneas, musculares y articulares, hematológicas y gastrointestinales. Característica la tos no productiva que permite diferenciar esta neumonía de otras.

Aislamiento

- ◇ Lavados broncoalveolares
- ◇ Biopsia
- ◇ Broncoaspirado
- ◇ Esputo
- ◇ Exudados faríngeos (conveniente utilizar un medio de transporte)

El aislamiento se puede realizar en medios selectivos específicos para este microorganismo. Suelen ser medios difásicos y requieren la presencia de penicilina, que inhibe el crecimiento de las bacterias (pues afecta a la síntesis de peptidoglucano), pero no afecta al crecimiento de Mycobacterias. Otras sustancias que inhiben el crecimiento son:

- Acetato de Talio ! inhibe el crecimiento de los hongos
- Azul de Metileno ! inhibe a otras especies de Micoplasmas

Como es un m.o fermentador de la Glucosa, los cambios producidos del pH son detectados por el indicador que contenga el medio.

Las colonias de M. Pneumoniae son esféricas, muy pequeñas y presentan una zona central más oscura que está inmersa en el agar. Además, puede aparecer un halo esférico de color amarillo-limón (huevo frito)

La observación debe hacerse con una lupa ó con el microscopio (objetivo de bajo aumento).

Siempre que se consiga el aislamiento de M. Pneumoniae es significativo de infección, ya que este m.o no forma parte de la flora saprofita orofaríngea.

Diagnóstico Serológico

- ◇ **Detección de criohemaglutininas:** son Ac de la clase IgM que están dirigidos contra Ag eritrocitarios de la clase I.
- ◇ **FC:** detecta IgM e IgG

◇ ELISA: detecta IgM, IgG e IgA

Diagnóstico serológico específico para M. Pneumoniae

◇ **Detección de criohemaglutininas**

◇ **Ag de membrana:** son glucolípidos asociados a proteínas que guardan similitud con estreptococos, Ag I hematíes humanos y otros Ag de diversos tejidos. Se producen los siguientes Ac: Ac anti-I (hemólisis) y Autoanticuerpos (producen reacciones autoinmunes contra el tejido del cerebro, tejido pulmonar y músculo liso).

MICOPLASMAS UROGENITALES: M. Hominis;

Ureaplasma urealyticum

Hay sistemas comerciales que detectan los M. Urogenitales y a la vez realizan el antibiograma (prueba de sensibilidad).

UREAPLASMA UREALYTICUM

El cuadro clínico consiste, en el hombre, en uretritis no gonocócica, prostatitis y epididimitis; y en la mujer, en endocervix. Se trata de una enfermedad pélvica inflamatoria.

M. HOMINIS

Es un saprofita normal de la vagina. Puede producir infecciones como m.o oportunista, generalmente salpingitis.

2.7 SECCIÓN 12: COCOS GRAM +

FAMILIA I : MICROCOCCACEAE

GÉNEROS:

- ◆ MICROCOCCUS
- ◆ STOMATOCOCCUS
- ◆ PLANOCOCCUS
- ◆ STAPHYLOCOCCUS

FAMILIA I: MICROCOCCACEAE / GÉNERO IV. ESTAFILOCOCO

Son Cocos Gram+, aerobios y anaerobios facultativos, inmóviles, Catalasa +, no esporulados, generalmente no capsulados y se agrupan en racimos u otras formas (parejas, tetradas,...). Resisten a la acción del calor, sales biliares, cloruro sódico 9,5% y a la optoquina.

El género Staphylococcus se compone de 27 especies, la mayor parte de las cuales son flora habitual del hombre y se

localizan preferentemente en la piel y en las mucosas.

De entre las especies de *Staphylococcus*, las que se asocian con más frecuencia a infecciones son *S. aureus* (Coagulasa+), *S. epidermidis* (Coagulasa-) y *S. saprophyticus* (Coagulasa-).

Crece bien en los medios habituales de laboratorio. Las muestras clínicas en las que se sospecha que pueden contener *Staphylococcus* se siembran en un medio general como el Agar Sangre y en un medio líquido como el Caldo de Tioglicolato o el Caldo de Infusión de Cerebro-Corazón.

***S. aureus* !** Colonias de color amarillo anaranjadas

***S. epidermidis*!** Colonias blanco grisáceas

***S. saprophyticus* !** Colonias grandes, de aspecto brillante y opacas

AISLAMIENTO DE STAPHYLOCOCCUS DE MUESTRAS MUY CONTAMINADAS

Como muestras contaminadas se refiere por ejemplo a heces. Se utilizan medios selectivos:

- ◊ Agar Sal y Manitol: *S. aureus* y *saprophyticus* ! acidifican el medio
- ◊ Agar Sal lipasa-manitol: *S. aureus* ! zona amarilla alrededor de la colonia y una zona opaca por la precipitación de los lípidos.
- ◊ Agar Columbia
- ◊ Agar Alcohol-Feniletílico

IDENTIFICACIÓN

- Resiste a la Bacitracina: permite diferenciar entre *Staphylococcus* y *Micrococos*.
- Prueba de la Catalasa: permite diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*.
- Morfología de la colonia
- Fermentación de Carbohidratos
- Coagulasa
- Hemólisis
- Resistencia a la Novobiocina
- Actividad Fosfatasa
- Desoxirribonucleasa
- Ureasa

Prueba de la Coagulasa

S. aureus es capaz de producir una proteína llamada Coagulasa que es capaz de aglutinar el plasma en presencia de un factor contenido en el suero. Este factor reacciona con

la coagulasa, activa el fibrinógeno y produce un coágulo de fibrina. Esta coagulasa se puede encontrar de forma ligada o en forma libre.

El estudio de esta actividad coagulasa se puede llevar a cabo en tubo o en portaobjetos:

En Portaobjetos:

- ◇ Poner una gota estéril de agua destilada o solución salina fisiológica sobre el porta.
- ◇ Emulsionar suavemente con una suspensión espesa de Staphylococcus o una colonia tomada con un asa.
- ◇ Mezclar suavemente la suspensión de Staphylococcus con el plasma que podamos tomar con un asa.
- ◇ Observar la inmediata formación de un precipitado macroscópico.

Prueba Positiva Prueba Negativa

Acentuada aglutinación ! 5-20 sg No se observan cambios, la

Retardada ! 20 sg-1min suspensión permanece homogénea

Dudosa ! > 1min

En el caso de que la aglutinación sea dudosa, será necesario repetirla o realizar la prueba en tubo.

En tubo:

- ◇ Poner en un tubo estéril de hemólisis 0,5 mL de plasma de conejo y 0,5 mL de un cultivo en caldo o placa. En este último caso se tomará un número suficiente de colonias.
- ◇ Incubar en un baño a 37°C durante 4 horas. Observar cada 30 min.

Prueba Positiva Prueba Negativa

Se forma un coágulo o filamentos de fibrina definidas Sin cambios

- ◇ Completa: coágulo en todo el tubo
- ◇ Parcial

Prueba de la Hemólisis

S. aureus ! halo translúcido

S. saprophyticus y S. epidermidis ! No tienen capacidad hemolítica

Resistencia a la Novobiocina

Solamente *S. saprophyticus* es resistente. Se utilizan discos

Actividad Fosfatasa

Algunas especies de *S. aureus* y *S. epidermidis* producen la Fosfata Alcalina. Esta enzima actúa sobre el Difosfato de Fenolftaleína y los transforma en Fenolftaleína libre. Esta Fenolftaleína libre, al reaccionar con un álcali da lugar a un color rojo rosado brillante.

Reactivos:

- ◇ Sal Sódica Difosfato de Fenolftaleína al 0,5% en agua destilada. Debe estar esterilizado por filtro de membrana (0,22 μ m como diámetro del poro)

Medios:

- ◇ Caldo Nutritivo: 3 mL de caldo por tubo. Esterilizar y antes de enfriar añadir una gota de reactivo.
- ◇ Agar Nutritivo

Método utilizando el caldo nutritivo:

Se inocularán 2 tubos rotulados como A y B con un inóculo denso de un cultivo puro y reciente (18–24 horas).

Incubar a 35°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo añadir 1 gota de NaOH 10N al 40% al tubo A.

Si no hay viraje, lo desechamos y continuamos la incubación con el tubo B hasta 24 horas.

Método utilizando el agar nutritivo:

Esterilizamos el medio, lo dejamos enfriar y le añadimos 2 mL de fenolftaleína al 5% por cada 98 mL de medio. Lo mezclamos y plaqueamos.

Sembramos por estría con un inóculo poco denso, procedente de un cultivo puro y reciente e incubamos a 37°C durante 24 horas.

Para proceder con la lectura es necesario exponer las colonias al vapor de amoníaco. Esto se puede hacer de dos formas:

- ◇ Tras la incubación mantenemos las colonias sobre un frasco abierto
- ◇ Agregar 1 mL de amoníaco a la tapa de la placa de petri donde hemos realizado la siembra e invertimos el cultivo sobre ella.

Se considerará resultado positivo si aparece un color rojo rosado brillante

Se considerará resultado negativo si no se observan cambios. Colonias claras o blancas.

Prueba de la Desoxirribonucleasa (DNAasa)

Se utiliza el Agar DNAasa. Sembramos con una estría única de aproximadamente 2 cm de longitud y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Después de incubar añadimos, inundando la placa, ClH 0,1 N que reacciona con el DNA presente apareciendo una zona turbia.

A los 5 minutos realizamos la lectura de los resultados:

- ◇ Se considera prueba positiva si aparece una zona clara alrededor de la línea de siembra.
- ◇ Se considera prueba negativa si aparece turbidez en toda la superficie del medio de cultivo.

En ocasiones este medio lleva indicadores que nos indican si el m.o posee la DNAasa sin necesidad de añadir el HCl. Estos indicadores pueden ser:

- Verde de Metilo: prueba positiva ! halo claro / prueba negativa ! verde intenso
- Azul de Toluidina: prueba positiva ! halo rosa / prueba negativa ! halo azul

(se puede añadir sobre el propio crecimiento)

Prueba de la Ureasa

Pruebas que ponen de manifiesto la producción de ácido por fermentación de carbohidratos

Utilización de Sistemas Comerciales de identificación: basados en pruebas bioquímicas, enzimáticas...(Ej. API)

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Puesto que Staphylococcus es una bacteria Gram+ tiene una estructura antigénica compleja y muy variada:

- ◇ Peptidoglucano: es un polisacárido constituido por N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. El peptidoglucano induce a la producción de Interleuquina I (*) y de Ac opsonizantes (*), además proporciona una actividad endotóxica.
- ◇ Ácidos Teitoicos
- ◇ Proteína A: se une a la región Fc (*) de la IgG y

activa el complemento (*)

◊ Factor de aglutinación: coagulasa unida (fijada) ! fija fibrinógeno

◊ Polisacárido:

S. aureus ! cápsula polisacárida que inhibe la fagocitosis

S. epidermidis ! exopolisacárido (Slime) que permite la adherencia a superficies plásticas, además de contribuir a la resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares.

ENZIMAS

Coagulasa, Hialuronidasa, – Lactamasas, Nucleasas, Lipasas

TOXINAS

Alfa toxina: actúa sobre la membrana de los eritrocitos

Beta toxinas: degrada enfingomielina (*)

Gamma toxina: lisa eritrocitos

Delta toxina: ejerce una acción detergente sobre membranas biológicas

Toxina esfoliativa: produce daños dermatológicos (Síndrome piel escaldada)

Toxinas implicadas en el Síndrome del Shock Séptico

Enterotoxinas: termoestable, resiste la acción de las enzimas del tubo digestivo. Se producen cuando los *Staphylococcus* crecen en alimentos ricos en carbohidratos y proteínas.

PATOGENIA

S. aureus: 2–40% son portadores nasales y un 10% son mujeres (vagina)

◊ Infecciones de la piel: forúnculos, ántrax, celulitis, impétigo...

◊ Bacteriemias, endocarditis, meningitis, neumonía, osteomielitis...

◊ Síndrome del Shock Tóxico (fiebre, hipotensión, afectación multisistémica)

◊ Intoxicaciones alimentarias

S. coagulasa negativos:

◊ ***S. epidermidis***: bacteriemia, endocarditis infecciosa, peritonitis, osteomielitis, infección del tracto urinario, infección de catéteres y prótesis...

◇ **S. saprophyticus**: infecciones del tracto urinario
S. haemolyticus; S. lugdunensis; S. schleiferi ! oportunistas

(*) **Complemento**: es un conjunto de 20 proteínas que dan lugar a un sistema enzimático en cascada en el plasma. Sus funciones son las siguientes:

- ◇ Opsonización
- ◇ Quimiotaxis
- ◇ Aumento del flujo sanguíneo y permeabilidad capilar en infección (inflamación)
- ◇ Lisis celular, bacterias y hongos

El complemento se puede activar por dos vías:

- Vía Clásica: activada por la unión del Ag al Ac. Esta unión activa los siguientes escalones C1, C2...hasta llegar al C3.
- Vía Alternativa: activada por los polisacáridos cuando la infección es producida por bacterias Gram+. Igual que la anterior finaliza en el C3.

A partir de la Fracción C3 se produce la activación de la C3a y C3b. C3a va activando consecutivamente otras fracciones dando lugar a la inflamación. Por su parte, C3b da lugar a la opsonización, relacionada con la quimiotaxis.

(*) **Estructura de las Ig:**

(*) **Opsonización**: Es el proceso por el cual las bacterias se hacen atractivas a los fagocitos. El germen se une a la IgG y C3b (proteínas plasmáticas) y de esta forma el microorganismo se hace más fácilmente reconocible por los fagocitos (se modifica la estructura fisiológica de la bacteria).

(*) **Linfoquinas**: son proteínas liberadas por los linfocitos TD.

- ◇ Factor quimiotáctico
- ◇ Factor inhibidor de la migración de los macrófagos
- ◇ Factor activador de macrófagos
- ◇ **Interleuquina I**: promueve la activación y multiplicación de los linfocitos B y T. El Ag estimula a la célula presentadora de Ag y ésta secreta Interleuquina I que activa los linfocitos T (fabrican la Interleuquina II)
- ◇ Interleuquina II Interferol

(*) **Esfingomielina**: La esfingomielina está constituida por esfingosina (forma parte de los cerebrósidos), ácido fosfórico, ácidos grasos, colina (transporte de grasas) y se

localiza en grandes cantidades en el cerebro y en el tejido nervioso. Es degradada por las toxinas de los Estafilococos.

OTROS GÉNEROS: STREPTOCOCCUS

Los Estreptococos son cocos Gram⁺ (en cultivos viejos pueden perder su carácter Gram⁺), inmóviles, Oxidasa y Catalasa – que se observan al microscopio en parejas o en cadenas de diferente longitud. Las células aisladas tienen forma esférica u ovoide. Cuando se presentan en parejas pueden tener aspecto de bacilo.

Son m.o anaerobios facultativos, aunque hay cepas que crecen mejor en condiciones microaerófilas.

Las pruebas de la Catalasa y de la Oxidasa les diferencian de los cocos Gram[–] de género Neisseria que son positivos para estas pruebas.

Los Estreptococos son m.o que están ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de ellos son flora habitual del hombre y otros se asocian a infecciones bien por acción directa o por fenómenos de sensibilización.

La clasificación de los Estreptococos resulta compleja por lo cual se recurre a una combinación de factores morfológicos, bioquímicos y serológicos.

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

- ◇ Ag de la pared: es específico de grupo y se denomina carbohidrato C. Está localizado en la pared celular lo que permite clasificarlos serológicamente en los llamados grupos de Lancefield.
- ◇ Proteína M: se trata de un Ag proteico que se encuentra en la pared celular y constituye el principal factor de virulencia del Strept. pyogenes que es un Estreptococo perteneciente al grupo A.

Esta proteína se encuentra en unas proyecciones similares a las fimbrias que sobresalen de la pared celular. Su presencia o ausencia condiciona la virulencia de la cepa. En el caso de que en el huésped no existan Ac frente a esta proteína, las cepas de S. pyogenes con dicha proteína son capaces de resistir la acción fagocítica de los leucocitos. Además, esta proteína también está implicada en los procesos de adherencia a células epiteliales.

◇ Otros Ag:

- Proteína T y R: se encuentran en la pared celular.
- Nucleoproteínas

- Cápsula polisacárida (S. pneumoniae)

TOXINAS Y ENZIMAS

- ◇ Streptocinasa o Fibrinolisisina: la poseen los Strept. hemolíticos del grupo A
- ◇ Streptodornasa o Desoxirribonucleasa Estreptococica.
- ◇ Hialuronidasa
- ◇ Toxina eritrogénica: produce lesiones cutáneas propias de la escarlatina.
- ◇ Hemolisina: hemólisis-completa / hemólisis-incompleta
- ◇ Estreptolisina (S. pyogenes): tipo 0 / Tipo S

AI SLAMI ENTO

Medios Generales que contengan sangre o derivados:

- ◇ Agar Columbia
- ◇ Agar Tripticasa Soja con un 5% de sangre de carnero
- ◇ Agar Chocolate

Medios de Enriquecimiento

- ◇ Caldo Tripticasa Soja
- ◇ Caldo Todd-Hewit

Medios Selectivos

- ◇ Agar Columbia suplementado con Colistina-Nalidíxico
- ◇ Agar feniletílico

Medios Selectivos de Enriquecimiento

- ◇ Medio de Todd-Hewit modificado. Posee Azida Sódica (inhibe la presencia de Gram-) y Cristal Violeta (inhibe los posibles Stafilococcus de la muestra).

IDENTIFICACIÓN: Pruebas Bioquímicas:

- **Sensibilidad a la bacitrocina** (Streptococcus del grupo A)
- **VP**
- **Hidrólisis del Hipurato:** pone de manifiesto si el Estreptococo tiene una enzima que actúa sobre el Hipurato que es la hipurinasasa. Se revela con un reactivo. Esta prueba sirve para Strep. del grupo B, cepas del grupo D y algunos hemolíticos.
- **Tolerancia a la sal:** diferenciamos a los Enterococos de los hemolíticos A, C, F, G y del S. viridans porque

los Enterococos toleran la sal (alto contenido salino: 6,5).

- **Prueba de la Bilis Esculina:** los Strept. del grupo D hidrolizan la esculina en presencia de bilis dando como productos esculetina y glucosa.

El medio que se usa es el Medio Bilis Esculina que es sólido y se deja enfriar inclinado. La siembra se realiza a partir de un caldo, depositando dos gotas con una pipeta o un asa. La incubación se hace a 35–37°C durante 48–72 horas.

Si la prueba resulta positiva se observa un color negro en la mitad o más de la superficie.

Si la prueba resulta negativa no hay ennegrecimiento o aparece en menos de la mitad del medio.

- **Solubilidad en Bilis:** esta prueba se usa para diferenciar neumococos de otros Strept. del grupo viridans. La bilis lisa las células de *S. pneumoniae* y, por el contrario, no es capaz de solubilizar las células de otros Strept. de ese grupo viridans.
- **Sensibilidad a la Optoquina:** esta prueba nos permite diferenciar entre neumococos, que son sensibles a la optoquina, y Strept. hemolíticos, que son resistentes. Se realiza de forma similar a la de la bacitrocina.
- **Utilización de Carbohidratos.**
- **Prueba de CAMP:** sembramos en una placa de Agar Sangre estreptococos de forma perpendicular y sin tocarse a una siembra de *S. aureus*. Si el m.o se trata de un Strept. del grupo B se producirá una sustancia llamada CAMP que en presencia de los Estafilococos producen una zona de lisis en forma de punta, agrandando la zona de hemólisis.

Ejercicio: Hacemos un urocultivo. Sembramos un agar sangre y un agar MacConkey. Las posibles opciones son las siguientes:

No hay colonias

Agar sangre Crecen colonias iguales

Crecen colonias distintas

Agar MacConkey Crecimiento

No crecimiento

PATOLOGÍA

◇ Ag específico de grupo (c): nos permite la clasificación de los Estreptococos –hemolíticos. Es un carbohidrato.

◇ Proteína M: la posee el S. pyogenes el grupo A
– **Hemolíticos (S. pyogenes del grupo A)**

Las infecciones producidas por S. pyogenes se pueden clasificar en tres grandes grupos:

◆ Enfermedades por invasión de tejidos:

◇ Erisipela: inflamación aguda de la piel con afectación de los vasos linfáticos cutáneos que cursa con fiebre elevada y escalofríos. El área afectada suele ser la cara y, en ocasiones, el tronco y las extremidades.

◇ Fiebre puerperal y sepsis: comienza como una infección del útero como consecuencia de un parto o de un aborto y puede evolucionar desde la infección uterina hasta una peritonitis produciendo en algunos casos cuadros de septicemia.

◇ Enfermedades por infección localizada producida por S. pyogenes y sus productos:

- Faringitis: aparece inflamación, fiebre, afectación de los ganglios linfáticos del cuello. Se da un elevado porcentaje de portadores asintomáticos. El tratamiento es importante para prevenir posibles complicaciones como la fiebre reumática y la glomerulonefritis.
- Fiebre Escarlatina: se produce en aquellos casos en los que las cepas de S. pyogenes producen una toxina eritrogénica que afecta a pacientes que no están inmunizados. Se caracteriza por inflamación de tejidos que pueden llegar a formar abscesos localizados generalmente en las anginas y que pueden llegar a bloquear el paso del aire. Se observa también un exantema de color rosado que se acompaña de fiebre.
- Pioderma (impétigo): vesículas rellenas de un líquido purulento son estafilococos en su interior. Los Estreptococos también pueden producir un impétigo similar al producido por Estafilococo.
- Endocarditis; Meningitis; Otitis y Neumonías.

◊ Enfermedades por hipersensibilidad tras infección estreptocócica no supurativas:

- Fiebre reumática: es una complicación de tipo autoinmune que generalmente se expresa en forma de artritis, aunque también puede producir afectación cardíaca originando lesiones en las válvulas del corazón. El elemento desencadenante suele ser una faringitis estreptocócica donde los síntomas aparecen de 1 a 5 semanas después de que la infección original haya desaparecido. Los mecanismos por los cuales se produce esta fiebre reumática son:
 - Los Ag bacterianos que se depositan en las articulaciones y el corazón y cuando el organismo produce Ac contra ellos se originan complejos que podrían ser el origen de la lesión.
 - Los Ag estreptocócicos dan una reacción cruzada con componentes del músculo cardíaco que induce a la producción de Ac que posteriormente lesionarán el corazón.
 - ◆ Glomerulonefritis: está originada por cepas de Estreptococos que tienen especial afinidad por el riñón.

NOTA: En las enfermedades postestreptocócicas no supurativas el Estreptococo no se encuentra en la lesión sino que ésta se origina por unos complejos como consecuencia de la interacción Ag-Ac (reacciones de hipersensibilidad).

Streptococcus agalactiae B (-hemolítico)

Es el agente etiológico más frecuente de sepsis y meningitis neonatal. También puede producir osteomielitis, infección del tracto urinario, endocarditis y neumonías.

Streptococcus de los grupos C y G

Son habituales en la garganta, tracto gastrointestinal y vagina. Pueden producir faringitis y bacteriemia.

Streptococcus bovis del grupo D: Produce endocarditis y bacteriemias

Streptococcus anginosus: produce abscesos y otras

infecciones purulentas

Streptococcus pneumoniae: forma parte de la flora normal de la naso-orofaringe y produce neumonía bacteriana extrahospitalaria; otitis, sinusitis y peritonitis y es el segundo agente etiológico productor de la meningitis bacteriana.

Streptococcus del grupo viridans: forma parte del tracto gastrointestinal y respiratorio. Da lugar a infecciones como m.o oportunista. De este grupo los más importantes son S. mutans y S. sanguis I y II

Enterococos

Son flora normal fecal del hombre y animales. También pueden localizarse en la cavidad oral y en la vagina. Las especies que se aíslan con más frecuencia son: E. faecalis y E. faecium.

◇ **SECCIÓN 13: BACILOS Y COCOS FORMADORES DE ESPORAS**

GENERO BACILLUS

Son grandes bacilos, Gram+ y formadores de esporas. Comprende numerosas especies que están ampliamente distribuidas en la naturaleza de las que sólo unos pocos tienen importancia como patógenos. Hay que destacar que, dada su ubicuidad y, que por ser m.o saprofitos, se aíslan frecuentemente como contaminantes. Se caracterizan por crecer, la mayoría de ellos, a la temperatura de 37°C, se desarrollan en medios generales, son m.o aerobios, aunque algunos se comportan como anaerobios facultativos y, además, son formadores de esporas.

Las dos especies más importantes desde el punto de vista patológico son Bacillus anthracis y Bacillus cereus.

BACILLUS ANTHRACIS

Es el m.o causante del Carbunco ó Antrax que es una enfermedad que afecta primariamente al ganado y que desarrolla patologías en las personas que trabajan con animales infectados o que manipulan sus productos.

Es un m.o que puede transmitirse por inhalación, por lo que el aislamiento del mismo se debe realizar extremando las medidas de seguridad con el fin de

que no se produzcan aerosoles durante su manipulación.

Se desarrolla en Agar Sangre y se puede realizar su identificación a partir de las lesiones que produce mediante la tinción de Gram o por inmunofluorescencia. Las colonias son planas, con prolongaciones que le dan un aspecto de cabellera y de un color blanco opaco.

Las **pruebas bioquímicas** que se realizan para la identificación de *Bacillus anthracis* son:

B. anthracis B. cereus

Colonias en Agar Sangre ----- gris
blanquecino ----- ligero matiz
verdoso

Movilidad ----- -
----- +

Susceptibilidad a la penicilina ---- +
----- -

Citrato ----- +
----- V

Crecimiento en 7% de NaCl ----- +
----- +

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Puede dar lugar a una manifestación cutánea, pulmonar o gastrointestinal.

La más común es la **Cutánea** que se produce en la cabeza, cuello o extremidades superiores más expuestas al contagio. La penetración de las esporas se produce a partir de pequeñas lesiones de la piel en estas zonas más expuestas al contagio.

La manifestación **Pulmonar** se produce por inhalación de las esporas cuando hay una exposición al polvo en el que están suspendidas. Esta manifestación se produce con mayor frecuencia en personas que trabajan en industrias donde se manipulan cuero o pieles de animales contaminados.

La manifestación **Gastrointestinal** es la forma menos frecuente de manifestarse *B. anthracis*.

IDENTIFICACIÓN

A partir de muestras sanguíneas, NO pulmonares porque los macrófagos de los alvéolos los transportan a los vasos linfáticos.

Cuando se producen lesiones cutáneas, se pueden tomar muestras cutáneas.

BACILLUS CEREUS

Es un m.o capaz de producir toxoinfecciones alimentarias que están motivadas por la producción de una enterotoxina. El diagnóstico se suele hacer mediante el aislamiento del germen a partir de los alimentos sospechosos de estar contaminados o bien a partir de las heces de los pacientes.

En ocasiones, B. cereus, puede comportarse como un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos.

◇ SECCIONES 14 Y 15: BACILOS GRAM+ NO FORMADORES DE ENDOESPORAS

GÉNERO LISTERIA

La especie más importante es Listeria monocytogenes, que es un m.o anaerobio facultativo aunque también crece en condiciones aerobias y microaerofílicas. Produce catalasa y es capaz de crecer a distintas temperaturas en medios generales.

Es una bacteria móvil que desarrolla mayor movilidad a 25°C que a 37°C. Esta movilidad, en agar semisólido presenta un aspecto característico que adopta una forma de sombrilla.

Los aislamientos que se realizan en Agar Sangre presentan una estrecha zona de hemólisis alrededor de las colonias.

Es un m.o que está ampliamente distribuido en la naturaleza y se asocia a enfermedades que afectan tanto a peces, aves y mamíferos.

Se han descrito gran variedad de manifestaciones clínicas, entre ellas las más significativas son:

- Sepsis o meningitis en pacientes inmunodeprimidos
- Sepsis puerperal (en la fase después del

parto)

· **Sepsis o meningitis neonatal:** es la más frecuente. La infección del feto se puede producir por dos mecanismos:

- Tras una bacteriemia de la madre se infecta la placenta y, posteriormente, el feto produciéndose una septicemia que afecta al Sistema Nervioso Central.
- El feto se infecta durante el parto.

Esta listeriosis neonatal se puede manifestar de una forma precoz más frecuente en prematuras o bien como una forma tardía que se produce generalmente entre la 1ª y 4ª semana de vida del feto.

El diagnóstico de laboratorio se realiza a partir de la sangre o del líquido cefalorraquídeo aunque también se pueden utilizar para su diagnóstico secreciones del tracto genital, líquido amniótico o tejido fetal.

Las tasas de aislamiento primario de la *Listeria* se pueden mejorar realizando un enriquecimiento en Caldo de Triptosa a temperatura de 4°C y realizando subcultivos semanales.

Además se pueden usar pruebas bioquímicas para su identificación, como la prueba de la Catalasa, Voges-Proskauer, la producción de ácido a partir de azúcares (Ej. manitol).

GÉNERO CORYNEBACTERIUM

Comprende un grupo de bacilos Gram+, no esporulados que generalmente son inmóviles y que pueden contener gránulos en su interior. Son pleomórficos y, lo más característico es que cuando se observan al microscopio adoptan una posición que se asemeja a letras chinas.

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza por lo que se encuentran en plantas, animales y en el hombre formando parte de la flora habitual.

Las *Corynebacterias* son m.o aerobios o microaerofilicos siendo la especie tipo *Corynebacterium diphtheriae* que en ocasiones es capaz de producir un toxina y, por lo tanto, ser un m.o patógeno. Las demás especies de *Corynebacterium* son patógenos oportunistas que se aíslan con frecuencia como contaminantes.

Corynebacterium diphtheriae es el agente

etiológico de la difteria, enfermedad infecciosa causada por las cepas toxigénicas. Normalmente, la vía de entrada es la mucosa respiratoria donde se multiplica y produce la exotoxina que causa una necrosis de los tejidos provocando una respuesta inflamatoria con formación de una membrana que en ocasiones puede dificultar el paso del aire. En ocasiones esta toxina también puede afectar al corazón y a los nervios periféricos.

El diagnóstico de laboratorio se realiza a partir de los cultivos de nasofaringe y garganta inoculándose en el agar de Loeffler.

Otras Especies de *Corynebacterium* son causantes de zoonosis y se aíslan de forma excepcional como patógenos oportunistas.

Las especies que pueden proceder de la flora endógena de hombre son:

***Corynebacterium jeikeium*:** tiene como característica principal su gran resistencia a los antibióticos. Son patógenos oportunistas y se asocian a endocarditis como consecuencia de cirugía en la que se colocan dispositivos intravasculares.

***Corynebacterium urealyticum* (D2):** produce infecciones del tracto urinario por lo que cuando se sospecha su presencia es necesario mantener la incubación durante al menos 48 horas ya que su crecimiento, en ocasiones, se produce lentamente.

GÉNERO LACTOBACILLUS

Son bacilos Gram+, pleomórficos, normalmente inmóviles, microaerófilos y Catalasa negativos. Reciben el nombre de *Lactobacillus* porque el principal producto de su metabolismo es el ácido láctico. Toleran bien el pH ácido y son flora habitual del cuerpo humano.

De entre los *Lactobacillus* destacar *L. acidophilus* también llamado Bacilo de Döderlein que está presente como flora habitual normal de la vagina. Como patógeno oportunista se ha aislado en casos de neumonía y en ocasiones como causante de infecciones del tracto urinario.

GÉNERO GARDENELLA

Este género ha sido clasificado en la Sección 15

como Gram+ no formador de esporas y también en la Sección 5 como Gram- anaerobio facultativo. Esto es debido a que su pared celular tiene una estructura similar a las bacterias Gram+ pero es más fina que lo habitual, por eso es un m.o Gram variable.

GARDENELLA VAGINALIS

Es la única especie con significación clínica. Es un m.o que se encuentra formando parte de la flora normal de las mujeres en tantos porcentajes que oscilan desde un 20% hasta un 70%.

Este m.o tiene importancia porque es el agente etiológico de la **Vaginitis Bacteriana**. Este síndrome consiste, desde el punto de vista clínico, en la presencia de un exudado vaginal mal oliente que se caracteriza por un aumento significativo de *Gardenella vaginalis* que se asocia con flora anaerobia, generalmente a los géneros *Bacteroides* y *Peptostreptococcus*. Además, se observa ausencia de *Lactobacillus*.

El Diagnóstico de Vaginitis Bacteriana se realiza mediante el examen en fresco del exudado vaginal estableciéndose el diagnóstico cuando se dan al menos 3 de los siguientes signos:

- Flujo vaginal abundante
- PH > 4,5 – 5,5 en exudado vaginal
- Presencia de células Clue o células indicadoras: son células del epitelio vaginal que se han descamado y aparecen rodeadas de cocobacilos Gram-, con lo cual, los bordes pierden nitidez y aparecen como mordidos.
- Prueba de Aminas positiva: consiste en añadir 1 gota de KOH al 40% sobre el exudado. Si la prueba es positiva, se desprende un fuerte olor a pescado debido a la liberación de aminas (putrescina y cadaverina).

Además de la Vaginitis Bacteriana, en ocasiones *Gardenella* da lugar a cuadros de endometritis, infecciones de heridas quirúrgicas en casos en los que se han practicado cesáreas, etc.

Se suelen tomar dos muestras de exudado vaginal, una para el examen en fresco y otra para el cultivo. Si la muestra no va a procesarse inmediatamente es necesario el uso de un medio de transporte.

El **examen en fresco** consiste en una tinción de Gram en la cual veremos cocobacilos Gram– y será característica la ausencia de Lactobacillus.

El **cultivo** se puede realizar en medios selectivos para Gardenella o bien utilizar Agar Sangre, en el cual se observará una hemólisis .

Por último también se pueden realizar **Pruebas Bioquímicas** como la Catalasa y la Oxidasa que serán negativas. Aún así, el diagnóstico es fundamentalmente clínico, junto con el examen en fresco.

2.10 SECCIÓN 16: MICOBACTERIAS

FAMILIA: MYCOBACTERIACEAE

GÉNERO: MYCOBACTERIUM

Son Bacilos rectos o ligeramente curvados, que en ocasiones pueden presentar aspecto filamentosos. Son aerobios, inmóviles y no esporulados.

En su pared celular contienen ácidos micóticos, que son ácidos grasos de cadena larga que les confieren la propiedad de Ácido Alcohol Resistencia. Cuando se tiñen mediante la tinción de Gram lo hacen escasamente y se comportan como Gram+. Los ácidos micóticos y los lípidos de su pared son los responsables de la resistencia que ofrecen las Micobacterias a la desecación y a la acción de colorantes, desinfectantes y agentes antimicrobianos.

CLASIFICACIÓN

- **Atendiendo a su velocidad de crecimiento:**
 - Crecedores Rápidos: crecen en un tiempo inferior a 7 días
 - Crecedores Lentos: crecen en un tiempo superior a 7 días
- **Atendiendo a su Morfología colonial**
- **Atendiendo a la propiedad de desarrollar pigmentos:**
 - Cromógenos
 - Escotocromógenas: crecen en la oscuridad
 - Fotocromógenas: no crecen en la oscuridad pero expuestas a la luz dan lugar a colonias

amarillo-anaranjadas.

· No Cromógenos

Atendiendo a estos criterios, podemos clasificar las Micobacterias en cuatro grupos:

GRUPO I: Fotocromógenas

GRUPO II: Escotocromógenas

GRUPO III: No cromógenas de crecimiento rápido

GRUPO IV: Crecedores rápidos

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La mayor parte de las muestras que se procesan para Micobacterias proceden del tracto respiratorio, generalmente pueden ser un esputo, brocoaspirado, líquido pleural, etc. De rutina se procesan también muestras de orina, LCR, biopsias y muestras quirúrgicas.

Aunque un frotis positivo para bacilos Ácido Alcohol Resistentes realizado a partir de estas muestras es sugestivo de infección tuberculosa, el diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis a partir del cultivo.

El procesamiento de las muestras para el estudio de Micobacterias requiere como paso inicial una concentración mediante centrifugación. Además, las muestras deben ser sometidas a un proceso de homogeneización y descontaminación previo a su siembra. Los líquidos generalmente estériles como el LCR no necesitan el proceso de homogeneización y pueden sembrarse directamente:

- ◇ Concentración por centrífuga
- ◇ Homogeneización ! Fluidificar (sustancias mucolíticas o sustancias detergentes)
- ◇ Descontaminación ! Álcali, ácido. Generalmente se utiliza la sosa (NaOH) no más de 15 minutos.

MEDIOS DE CULTIVO

NO SELECTIVOS

- Con Base de Huevo: Lowenstein Jensen: Coletsos. Suelen venir con un colorante (verde de malaquita) que inhibe la flora acompañante. Tienen la ventaja de que presentan mayor número de posibilidades de

positivos, es decir que es mayor en número de aislamientos.

- Con Base de Agar: Middlebrook 7H10, 7H11. Tiene la ventaja de que permite una detección más rápida.
- Líquidos: pueden ser de aislamiento, de enriquecimiento o de sensibilidad frente a antimicrobianos (7H9)

SELECTIVOS

DIFERENCIALES

NOTA: El único microorganismo que no crece en ninguno de estos medios es el *M. leprae*.

RADIOMÉTRICOS (BACTEC TB)

Composición: Como base poseen un medio líquido; contiene antibióticos y un sustrato marcado radiactivamente (se produce CO₂ que es detectado por el aparato)

Procedimiento: Cuando el índice radiométrico es superior a 10 hacemos una tinción AAR y un subcultivo.

Incubación: se llevará a cabo en medios de cultivo tradicionales a 35°C, en oscuridad, atmósfera húmeda, con un 5–10% de CO₂, durante una semana. El resto del tiempo se incubará de forma normal, hasta un máximo de 3–6 semanas. Los tubos siempre se incubarán en posición inclinada. No se cierran completamente para que esté seco ya que el agua inhibe el desarrollo adecuado de las características morfológicas.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- Test de la Niacina: las Micobacterias durante su crecimiento, producen en mayor o menor cantidad, ácido nicótico o niacina que es una sustancia que interviene en los procesos de oxidación–reducción del metabolismo de las Micobacterias.
- Reducción de Nitratos
- Catalasa: todas las Micobacterias, a excepción de algunas cepas de *M. tuberculosis*, poseen la enzima Catalasa. La actividad catalasa se puede determinar de varias formas:
 - Prueba semicuantitativa: se mide la altura que alcanzan las burbujas de

oxígeno en un tubo. Si la altura es superior a 45 mm la prueba es positiva.

- Prueba a 68°C: la mayor parte de las Micobacterias tienen dos enzimas catalasa, una termoestable y otra termolábil. Esta última se descompone al elevar la temperatura a 68°C por lo cual, las especies que solo tengan la enzima termolábil perderán su actividad catalasa al elevar la temperatura. Solamente poseen la enzima termolábil M. tuberculosis, M. bovis y M. africanum.

- Hidrólisis de Tween 80: esta prueba está basada en la hidrólisis enzimática de este producto, lo que conlleva la liberación de ácido oleico. Las Micobacterias escotocromógenas y no cromógenas de crecimiento lento dan positiva esta prueba.
- Test de la Aril Sulfatasa: las especies de Micobacterias de crecimiento rápido dan positiva esta prueba cuando dichas Micobacterias actúan sobre un sustrato liberándose fenoltaleína que, en medio alcalino, vira a color rosa.
- Reducción del Telurito: las Micobacterias pertenecientes al complejo Avium Intracellulare y las Micobacterias de crecimiento rápido, al reducir este compuesto dan lugar a un producto de color negro metálico a los 3–4 días de incubación del medio.

Además de estas pruebas se pueden realizar también crecimiento en NaCl al 5%; crecimiento en Agar MacConkey sin cristal violeta y la utilización del Citrato o el Manitol como única fuente de carbono.

OTROS MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN

- Sistemas Automáticos: son medios líquidos con un sustrato marcado.
- Sondas de ADN: a partir del cultivo
- Técnicas de cuantificación: directamente de la muestra
 - Detección de ADN: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la LCR (Reacción en Cadena de la Limerasa)
 - Detección de ARN: reacción

- mediada por transcripción
- Análisis Cromatográfico de los lípidos de la pared celular
- Cromatografía en capa fina
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

En ningún caso estas técnicas sustituyen el cultivo en medios habituales. Su ventaja es que, dado el largo período de espera para el crecimiento de las Micobacterias, se pueda dar un tratamiento precoz.

REALIZACIÓN DE BACILOSCOPIAS

Las baciloscopias se realizan a partir de esputos y broncoaspirados en el momento de su recepción y el resto de las muestras, tras el proceso de concentración y previo a la descontaminación. Estas muestras deben ser examinadas mediante una tinción AAR para el estudio de la presencia de Micobacterias en dichas muestras. La realización de un frotis y posterior tinción, no es un diagnóstico definitivo cuando es positiva pero permite un diagnóstico de presunción y también el seguimiento del paciente que está siendo tratado con antituberculosos de forma que se puede saber en qué momento las baciloscopias se hacen negativas.

Para la realización de una extensión se cogerá una cantidad mínima cantidad de la parte más purulenta del esputo extendiéndola sobre un porta limpio y desengrasado para que cubra las dos terceras partes de la superficie del porta. La fijación se puede realizar calentándolo a una temperatura de 60–70°C durante 30 minutos o, en su defecto, se realiza la fijación con la llama de un mechero. Las extensiones no deben ser ni demasiado gruesas ni demasiado finas, lo justo para permitir la lectura a través del frotis.

Los criterios que definen la calidad de un esputo son:

- Criterios macroscópicos: color amarillo; consistencia mucopurulenta
- Criterios microscópicos: se considerará un buen esputo aquel que contenga más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales.

Valoración cuantitativa del número de bacilos:

Si hay más de 50 bacilos en una línea no continuaremos con el recuento y se informará como 50/1.

Si en los 100 campos (primera línea) hay más de 10 bacilos y menos de 50 se informará con el número contado.

Si contamos menos de 10 bacilos en la primera línea se observarán las otras dos líneas hasta los 300 campos.

Otra forma de observar una baciloscopia es:

- 1–9 bacilos en 100 campos : expresar como N° bacilos/campo
- 10–99 bacilos en 100 campos ! +
- 1–10 bacilos por campo ! ++
- > 10 bacilos por campo ! +++

Causas de falsos positivos y falsos negativos

Falsos positivos: restos de comida, fibras de algodón, precipitados de colorantes...

Falsos negativos: mala realización de frotis (porque no se ha tomado la parte purulenta del esputo, porque el frotis es demasiado grueso, porque la fijación ha sido defectuosa...)

PATOLOGÍA

La principal patología es la Tuberculosis, producida por un complejo tuberculoso dentro del cual se encuentran M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti y cepas BCG.

Los factores de virulencia de estos microorganismos son las ceras, fosfolípidos, ácidos micólicos, proteínas, polisacáridos, factores tóxicos,...

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Es el agente etiológico de la Tuberculosis. Llega hasta los alvéolos pulmonares por inhalación de pequeñas exposiciones repetidas a los bacilos junto con una inmunidad deteriorada por parte del huésped para que se desarrolle la enfermedad. Los m.o se localizan en el pulmón donde proliferan y pueden dar lugar a 2 tipos de lesiones:

- Lesión exudativa: aparece una reacción inflamatoria que se acompaña de edema y además hay acumulación de poli y monomorfonucleares que rodean al bacilo tuberculoso. El cuadro se asemeja a una neumonía y puede curar espontáneamente,

producir una necrosis tisular o evolucionar a una lesión productiva.

- **Lesión productiva:** hay una inflamación crónica de los linfáticos que contienen en su interior los bacilos tuberculosos. Con el tiempo esta lesión se transforma en una especie de tubérculo con tejido caseoso (apariencia de queso) que acaba calcificándose. A estas lesiones de les denomina Complejos de Ghon.

Los bacilos pueden pasar desde los pulmones al torrente sanguíneo a través de los linfáticos y diseminarse por distintos órganos lo que da lugar a una tuberculosis miliar. Los órganos que suelen afectarse con mayor frecuencia son el hígado, riñones, huesos y médula ósea.

Micobacteriosis: son enfermedades producidas por m.o distintos a los pertenecientes al complejo tuberculosis, que son:

- *Mycobacterium Kansaii* : enfermedad pulmonar y sistemática similar a la tuberculosis
- Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*
- *M. scrofulaceum*: adenopatías cervicales, generalmente en niños
- *M. marinum* y *ulcerans*: lesiones superficiales
- *M. fortuitum-chelonei*

Tipos de Tuberculosis:

- **Infección primaria:** se produce cuando un individuo se pone en contacto por primera vez con el bacilo tuberculoso. Generalmente esto sucede en la infancia aunque también puede darse en la edad adulta en personas que son tuberculina negativa. En la mayor parte de los casos quedan focos residuales de bacilos tuberculosos en el pulmón. Estos focos pueden constituir la fuente de una futura reactivación o infección endógena generalmente por una disminución de la inmunidad. En el curso de la infección primaria el huésped adquiere hipersensibilidad al bacilo. La reacción a la tuberculina será entonces positiva pudiendo utilizarse

como diagnóstico.

- **Infección endógena:** se produce por reactivación de un foco primario.

Prueba de la tuberculina o MANTOUX:

Permite diferenciar entre individuos infectados u no infectados de modo que una reacción positiva indica que el individuo posee una hipersensibilidad celular a los Ag de *M. tuberculosis* como consecuencia del contacto previo, natural o adquirido, con la bacteria. Una prueba negativa significa que no hay riesgo de reactivación pero sí de contagiarse por una fuente externa.

En esta prueba el Ag se inyecta intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo y la prueba se lee a las 48–72 horas midiéndose el diámetro producido.

- Test positivo. Diámetro mayor o igual de 10mm en personas de 35 años
- Test positivo. Diámetro mayor o igual de 15 mm en personas de 35 o más años
- Test positivo. Diámetro mayor o igual de 5 en individuos en contacto con pacientes tuberculosos y pacientes VIH.

EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DEL M. TUBERCULOSIS

Tuberculosis: enfermedad de declaración obligatoria. Es más frecuente en los países subdesarrollados y, en los países industrializados, tiene mayor incidencia en grupos marginales (inmigrantes, VIH, alcohólicos,...).

Fuente y reservorio: el hombre

Contagio: por inhalación de gotas de saliva suspendidas en el aire

En el caso de *M. bovis* la fuente son los animales, generalmente la vaca, y el contagio se produce por inhalación o bien por vía oral cuando un individuo consume generalmente leche no pasteurizada.

Prevención: se dirige a dos frentes, uno de ellos es tratar de detectar las fuentes de tuberculosis y, en caso de detección dar un tratamiento precoz de sujetos en los que se observan signos de tuberculosis activa.

MYCOBACTERIUM LEPRAE

Es el agente etiológico de la Lepra. Se trata de una Micobacteria no cultivable en el laboratorio. El diagnóstico se hace por tinción de muestras tomadas de la piel o mucosas para la observación de bacilos ácido alcohol resistentes. Estos bacilos pueden aparecer de forma aislada, formando parejas o en masa. No existen pruebas serológicas para el diagnóstico de la Lepra. Se puede presentar bajo dos formas:

- Lepramatosa: se observan abundantes bacilos
- Tuberculoide: bacilos escasos

El mecanismo de transmisión consiste en múltiples exposiciones a las secreciones nasales de personas infectadas. El período de incubación es de 2-10 años.

TINCIONES ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES

Ziehl-Neelsen:

Fucsina fenicada durante 5 minutos hasta emisión de vapores

Lavar

Decolorar (alcohol-clorhídrico)

Lavar

Colorante de contraste (azul de metileno). Lavar

B. AAR rojos sobre fondo verde.

Tam-Thiam-Hok:

Cubrir con solución colorante de Kinyou durante 3 minutos

Lavar

Cubrir con solución colorante de Gabbet durante 1 minuto

Lavar

B. AAR rosas

Rodamina-Auramina (fluorescente):

Extender, secar y fijar

Cubrir con Rodamina–Auramina durante 15 minutos

Lavar

Añadir la solución decolorante durante 3 minutos

Lavar

Cubrir con el colorante de contraste 4 minutos

Lavar

B. AAR amarillo–naranja sobre fondo verde

2.11 BACTERIAS ANAEROBIAS

CARACTERÍSTICAS GENERALES

- No se desarrollan en presencia de Oxígeno
- Son microorganismos Endógenos
- Habitualmente forman parte de la flora habitual normal. Dan lugar a infecciones endógenas cuando colonizan lugares normalmente estériles.

CLASIFICACIÓN

- **ANAEROBIAS ERICTAS**: no toleran en ningún caso la presencia de O₂.
- **ANAEROBIAS AEREOTOLERANTES**: se desarrollan en presencia de pequeñas concentraciones de O₂.

ESPECIES QUE PRODUCEN INFECCIÓN EN EL INDIVIDUO

- ♦ Bacilos Gram+ no esporulados: Actinomices; Bifidobacterium; Propionibacterium
- ♦ Cocos Gram+: Peptostreptococcus
- ♦ Cocos Gram–: Veillonella
- ♦ Bacilos Gram+ esporulados
 - ◇ Clostridium : tetan; botulinum; perfringens; difficile (todos ellos originan infecciones exógenas)

- ◆ Bacilos Gram- :
Bacteroides del grupo fragilis y otros; Prevotella; Fusobacterium.

BACILOS GRAM+ ESPORULADOS. **CLOSTRIDIUM**

Generalmente se suelen encontrar tanto en el suelo como en el intestino del hombre y los animales.

Aunque se les define como Gram+, en los cultivos de más de 48 horas pueden aparecer como Gram-. Una de las características que presenta este género es la formación de esporas, aunque se producen de manera diferente dependiendo de la especie de Clostridium.

Patogenicidad

Depende de la liberación de exotoxinas y de la producción de enzimas con un alto poder destructivo. Clostridium puede dar lugar a diferentes cuadros clínicos:

- **Intoxicación alimentaria:** Producida por Clostridium perfringens. Es el cuadro clínico más frecuente. Consiste en la aparición de diarrea y dolor abdominal tras la ingesta de alimentos contaminados, generalmente carne. Las enterotoxinas que produce este tipo de Clostridium son las responsables de la infección. Estas toxinas se liberan a partir de las esporas del m.o cuando el alimento permanece a temperatura ambiente después de haber sido cocinado. La unión de la enterotoxina a las células epiteliales del intestino altera el equilibrio osmótico y provoca la diarrea.

El **diagnóstico de laboratorio** se realiza mediante la detección de C. perfringens en el alimento o bien en las heces de los pacientes. También se puede hacer la detección directa de la toxina en las muestras fecales.

- **Enteritis necrotizante:** Es otro de los cuadros producido por C. perfringens, en este caso del tipo C. Este Clostridium produce una toxina necrotizante que da lugar a una necrosis del tejido intestinal y a una diarrea sanguinolenta que se acompaña de vómitos y dolor abdominal.

El **diagnóstico** es fundamentalmente clínico ya que, el hecho de aislar o cultivar el m.o, no indica

necesariamente que haya infección.

- **Gangrena gaseosa:** El agente causal que se aísla con más frecuencia es *Clostridium perfringens* y la infección se produce a partir de heridas traumáticas o quirúrgicas contaminadas por el m.o. Consiste en una necrosis muscular y signos de toxicidad sistémica debido a la producción de toxinas citotóxicas.

El diagnóstico se realiza basándose en las manifestaciones clínicas y por la observación en la tinción de Gram de bacilos Gram+ de gran tamaño y con los extremos cuadrados, a partir de muestras obtenidas de los tejidos afectados.

- **Botulismo:** Producido por *Clostridium botulinum*.. Este *Clostridium* es capaz de producir una serie de neurotoxinas que son las responsables de la enfermedad. Se reconocen 4 formas clínicas producidas por *C. botulinum*:
 - Intoxicación alimentaria: es la forma más frecuente. Se produce tras la ingestión de alimentos contaminados, generalmente conservas vegetales. La gravedad de la enfermedad va a depender de la cantidad de toxina ingerida. Se manifiesta por una serie de síntomas neurológicos que afectan a la visión, hay afonía, ...
 - Botulismo de las heridas
 - Botulismo del lactante
 - Forma indeterminada: se manifiesta generalmente en niños menores de un año y en ellos no se encuentra la fuente de infección.

El diagnóstico del botulismo es fundamentalmente clínico, aunque se puede demostrar la presencia de la toxina en sangre y del m.o en heridas, tejidos afectados, alimentos, etc.

- ♦ **Tétanos:** Se produce por la potente acción de una neurotoxina elaborada por *Clostridium tetani*. La enfermedad consiste en una parálisis generalizada debido al bloqueo por la toxina de las uniones musculares de las neuronas

motoras. El diagnóstico es fundamentalmente clínico.

♦ **Colitis**

pseudomembranosa:

Producida por las toxinas de tipo A y B que produce el *Clostridium difficile*. Esta colitis se trata de un cuadro de diarrea tras un tratamiento con antibióticos de amplio espectro que altera la flora intestinal y permiten la multiplicación del m.o. En el laboratorio el método más específico es la detección directa de la toxina en las heces del paciente.

**COCOS ANAEROBIOS GRAM-.
VEILLONELLA**

Al microscopio se observan generalmente formando parejas, aunque también pueden encontrarse de forma aislada en forma de racimos o de cadenas. Son inmóviles y no forman endoesporas. Se encuentran formando parte de la flora normal de la boca y son uno de los componentes de la placa dental.

COCOS GRAM+. PEPTOSTREPTOCOCCUS

Forman parte de la flora habitual de la cavidad oral, la piel, tracto gastrointestinal y genitourinario. Se consideran m.o oportunistas y se aíslan con relativa frecuencia a partir de infecciones de heridas quirúrgicas, abdominales y pélvicas.

**BACILOS GRAM-. BACTEROIDES /
FUSOBACTERIUM**

El género Bacteroides comprende un extenso número de microorganismos que viven en el tracto gastrointestinal del hombre, aunque algunas especies también se encuentran en la boca, tracto respiratorio superior y tracto genital. Es una bacteria inmóvil que no forma endoesporas. Los Bacteroides se asocian generalmente a infecciones tras intervenciones quirúrgicas. De entre los Bacteroides, el grupo B. fragilis es el grupo más importante desde el punto de vista clínico.

Fusobacterium con m.o largos y delgados, con

extremos puntiagudos que, en el hombre, se encuentran principalmente en las encías y se asocian con abscesos dentales.

BACILOS GRAM+ NO ESPORULADOS. **ACTYNOMICES**

El género Actynomices son m.o que se encuentran habitualmente en la boca y garganta del hombre y de los animales. Ocasionalmente pueden dar lugar a la formación de filamentos.

El Actynomices israelí produce un cuadro clínico de actinomicosis, que es una enfermedad que cursa con destrucción de tejidos (principalmente tejido conjuntivo) y que suele afectar a la cabeza y al cuello. En ocasiones tiene una localización pulmonar.

FACTORES DE VIRULENCIA

- Capacidad de adherencia
- Polisacárido capsular (B. fragilis y otros)
- Producción de una endotoxina de los Gram-
- Producción de Ácido Succínico (destrucción celular)
- Producción de toxinas
- Enzimas: Hialuronidasa; Colágenas; Fibrinolisisina (dan lugar a una destrucción celular y además favorecen la diseminación)

CLÍNICA DE LAS INFECCIONES POR ANAEROBIOS

Las infecciones por anaerobios pueden ser producidas por Flora Polimicrobiana (Endógena) ó por flora Exógena o ambiental (Ej. Clostridium).

Los **signos** orientativos **de las infecciones** producidas por anaerobios son:

- Exudado maloliente característico
- Localización de la infección en lugares próximos a mucosas
- Necrosis de los tejidos y de abscesos
- Gas en los tejidos
- En muchas ocasiones se producen como consecuencia de mordeduras
- También son consecuencia de tratamientos previos con antibióticos (se elimina determinada flora pero permanecen los anaerobios).

MUESTRAS: RECOGIDA, TRANSPORTE Y

PROCESAMIENTO

Las **muestras** válidas para el estudio de infecciones producidas por anaerobios serán aquellas que procedan de lugares que normalmente son estériles. Si tomamos la muestra de otros lugares estaremos recogiendo además flora acompañante.

Algunos de los **medios** que se utilizan para el **transporte** de estas muestras son:

- Viales y tubos con atmósfera anaerobia y base de agar con indicador (las muestras pueden ser líquidas o hisopos)
- Hisopos con atmósfera anaerobia
- Bolsas o jarras de anaerobios, cuando lo que se quiere estudiar son tejidos

Procesamiento de las muestras:

MUESTRA SOSPECHOSA

Examen Directo Medios Sólidos Medio Líquido

Macroscópica Microscópica Ø Tioglicolato TG

Ø

Incubación O2 Incubación Anaerobia Incubación CO2

Agar Sangre AS ASA ACH (Chocolate)

Agar MacConkey ASLKV

BBE

PEA

El **Examen Macroscópico** consiste en olor desagradable, tejidos necróticos–purulentos...

La **Siembra** deberá realizarse tanto en medios selectivos como no selectivos y medios de enriquecimiento:

ASA: No selectivo. Sirve tanto para aerobios como para anaerobios

ASLKV: Kanamicina–Vancomicina. Medio selectivo anaerobios Gram–

PEA: Feniletil alcohol. Medio selectivo anaerobios Gram⁻ y Gram⁺

BBE: Bacteroides Bilis Esculina. Bacteroides grupo fragilis.

EXAMEN DE LOS CULTIVOS

- Inspección a las 48 horas de incubación. Si no crece, incubar hasta 1 semana antes de descartarlo como negativo.
- Inspección cuidadosa: Si aparecen colonias diferentes en el medio ASA (Agar Sangre para Anaerobios) deberemos realizar un subcultivo para cada tipo de colonia en cada uno de los siguientes medios: ASA, ACH, AS y realizar una tinción de Gram.

COLONIA SOSPECHOSA

ASA AS ACH (CO₂)

AEROBIO + + +

MICROAEROFÍLICO + - +

ANAEROBIO + - -

IDENTIFICACIÓN DE PRESUNTOS ANAEROBIOS

Dependiendo de las características del Laboratorio que se proponga identificar al m.o:

NIVEL I: se encargan del aislamiento y mantenimiento. Envían las muestras a centros de referencia donde se realiza la identificación,...Estos laboratorios deben ser capaces al menos de identificar a presuntos Bacteroides del grupo fragilis y a Clostridium perfringens.

NIVEL II: Son capaces de identificar a nivel de género ó grupo la mayor parte de los anaerobios mediante pruebas sencillas como son:

- Morfología de las colonias teniendo en cuenta el tamaño, la producción de pigmentos, hemólisis, etc.
- Sensibilidad a antimicrobianos: Kanamicina, Vancomicina, Colistina... La sensibilidad frente a estos antibióticos sirve para la

- identificación pero no para el tratamiento.
- Catalasa, Indol, Nitrato, Urea, Lecitina, Lipasa,...

2.12 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los **Antimicrobianos** son sustancias que se utilizan para tratar enfermedades infecciosas que se pueden obtener de forma sintética en el laboratorio o bien a partir de microorganismos, generalmente hongos. Los precursores de los antimicrobianos fueron Erlich y Fleming.

La diferencia entre **Antibiótico** y **desinfectante** está en que el primero es de uso interno, mientras que el último es de uso externo.

CRITERIOS DE VALORACIÓN DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

- Toxicidad Selectiva, es decir, que sea eficaz exclusivamente con los microorganismos pero que no resulte tóxico para las células del individuo.
- No provocar hipersensibilidad (reacciones alérgicas)
- Solubilidad en fluidos corporales. Deben penetrar rápidamente. Esta penetración viene dada por la velocidad de degradación y la velocidad de excreción.
- El m.o no debe hacerse resistente. Generalmente, los factores que contribuyen al aumento de la resistencia por parte de los m.o son los alimentos ingeridos, personal sanitario, uso inadecuado de antibióticos, etc.

ESPECTROS DE ACTIVIDAD

- **Corto espectro**
- **Amplio espectro** (el más usado): su principal ventaja es que cuando investigamos el m.o causante de la infección este medicamento nos proporciona tiempo y provisional tratamiento. La desventaja es que destruyen la flora habitual normal y pueden dar lugar a infecciones secundarias.

ACCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

- ♦ **Bactericidas:** es decir, que matan. Esta acción se desarrolla sobre la síntesis de proteínas del m.o; sobre la actividad enzimática; y sobre la formación de la pared celular.
- ♦ **Bacteriostática:** es decir, que inhibe o impide el crecimiento de los m.o.

CLASIFICACIÓN

- ◇ – **LACTÁMICOS:** su acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular, es decir, que actúan sobre el peptidoglucano. Se obtienen a partir de fuentes naturales así como de antibióticos producidos de forma semisintética. Tienen acción bactericida. Tipos:

- ◇ **PENICILINAS**

- **Penicilina G:** se puede utilizar asociándose con Procaina o Benzatina. Con esto lo que se consigue es aumentar la duración o permanencia del antibiótico en el organismo.

Penicilina V: se administra por vía oral ya que es estable frente al medio ácido del estómago.

Ambas ejercen su acción frente a bacterias Gram+, principalmente pneumococo y S. pyogenes. También se ha demostrado su actividad acción frente a anaerobios, espiroquetas, gonococos y meningococos. Es un antibiótico de corto espectro y baja toxicidad.

NOTA: No ataca a las bacterias Gram– porque el peptidoglucano está protegido por la membrana externa.

- **Aminopenicilinas:** las más significativas con Ampicilina y Amoxicilina. Además de la acción que ejercen la penicilina G y la V, son activas frente a algunas enterobacterias.
- **Isooxazolilpenicilinas:** estos antibióticos se utilizan contra unas cepas de S. aureus que son penicilinasa (–lactamasas) positivos. Estos m.o son resistentes al resto de antibióticos porque rompen el anillo –lactámico.

El principal representante de este grupo de antibióticos es la Meticilina. Otros son la Oxacilina y la Cloxacilina.

Algunas cepas de S. aureus se han hecho resistentes

a la Meticilina y se las denomina SARM

- **Carboxipenicilinas:** la más importante es la Carbenicilina. Ejerce su acción frente a todo lo anterior y además actúa sobre las bacterias Gram⁻.
- **Ureidopenicilinas:** la más significativa es la Piperacilina que tiene especial actividad frente a enterococos y otros estreptococos.
- **CEFALOSPORINAS:**

Su mecanismo de acción es similar al de las penicilinas. Se clasifican por generaciones, según las modificaciones que se han producido en el compuesto a lo largo del tiempo:

1ª Generación: Cefazolina de uso parenteral y Cefactor de administración oral. Presentan buena actividad frente a bacterias Gram⁺ y una actividad moderada frente a Gram⁻.

2ª Generación: Cefoxitina. Presenta una mayor actividad sobre las bacterias Gram⁻ y se administra tanto por vía oral como por vía parenteral.

3ª Generación: Cefotaxina de uso parenteral y Cefixina de administración oral. Tienen una peor respuesta contra las bacterias Gram⁺ pero presentan buena actividad sobre bacterias Gram⁻.

· **CARBAPENEMES**

El principal representante de este grupo de penicilinas es el Iminipen. La característica que presentan es que poseen un espectro de actividad extremadamente amplio. Son activos frente a todos los cocos ⁺ y ⁻, bacilos⁺, anaerobios y la mayor parte de enterobacterias.

Se deben asociar a la cilatina sódica para que no sea degradado en el proceso de filtración del riñón.

· **MONOBACTAMAS**

Son activos frente a bacterias Gram⁻, principalmente frente a enterobacterias y pseudomonas.

· INHIBIDORES DE – LACTAMASAS

Son, por ejemplo, el ácido clavulámico y se utilizan para bloquear la acción de las – lactamasas y que el antibiótico pueda ejercer su acción.

· INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

2.1 AMINOGLUCÓSIDOS

Pueden ser naturales o semisintéticos y tienen una actividad bactericida. El más significativo es la Estreptomicina que se aplica como antituberculoso, aunque también actúa sobre bacterias Gram–, principalmente el *S. aureus*.

Puesto que se trata de un inhibidor de la síntesis de proteínas, actúa sobre los ribosomas. Puede inhibir totalmente la síntesis de proteínas o bien conseguir que la célula bacteriana fabrique proteínas defectuosas.

Presentan sinergismo con –lactámicos, es decir, que la unión de ambos multiplica su acción.

2.2 TETRACILINAS

Son bacteriostáticos. El más significativo es la Doxiciclina. Presentan el mayor espectro de actividad (Gram+, Gram–, parásitos intracelulares). No es recomendable utilizarlos en niños menores de 8 años porque produce problemas en la dentición y en los huesos. Además suprimen la flora intestinal normal.

2.3 CLORANFENICOL

Son bacteriostáticos. Su espectro abarca a Gram+ y Gram–, clamydias, micoplasmas, espiroquetas,... Normalmente su utilización se reserva para infecciones graves debido a la toxicidad que presentan sobre la médula ósea (afecta la formación de células sanguíneas).

2.4 MACRÓLIDOS

El más significativo es la Eritromicina que posee un espectro medio (acción similar a la penicilina G). Actúa sobre las bacterias Gram+, mycobacterias, rickettsias, legionella. Se puede administrar por vía oral.

2.5 LINCOSAMIDAS

Similar a la anterior. La más representativa es la Clindamicina.

· **QUINOLONAS:** Son antibióticos de síntesis, de administración oral. Su acción es bactericida y actúa sobre las bacterias Gram-. Los más importantes son:

Ácido nalidíxico (Actúa a nivel de las vías urinarias)

Norfloxacin ()

Ciprofloxacina ()

· **GLUCOPÉPTIDOS:** No tiene relación con otros grupos de antibióticos. El más representativo es la Vancomicina que actúa sobre las bacterias Gram+, especialmente contra el S. aureus que es resistente a la meticilina. Tiene una elevada toxicidad renal y ótica.

· **SULFAMIDAS:** En muchas ocasiones presenta reacciones alérgicas en el individuo. Son bacteriostáticos y se administran por vía oral. Actúan sobre bacterias Gram+, Gram-, clamidias, parásitos.

Para aumentar la efectividad de las sulfamidas se suelen usar junto al Trimetopín.

· **NITROIMIDAZOLES:** Son bactericidas. Actúan sobre anaerobios y parásitos como la Giardia y Tricomonas. El más representativo es el Nitroimidazol.

· **POLIPEPTÍDICOS:**

- **Polimixinas:** Lesionan las membranas citoplasmáticas y son de uso tópico. Actúan frente a bacterias Gram- (Pseudomonas). Hay dos tipos B y E (colistina).
- **Bacitracinas:** Su mecanismo de

acción es similar al de las Polimixinas. Actúa frente a estafilococos y estreptococos del grupo A. Son de uso tópico.

- **OTROS**

- ♦ **Nitrofurantoina:** oral, vías urinarias. Actúa sobre las bacterias Gram⁻.
- ♦ **Ácido fusídico:** Actúa sobre S. aureus y cepas SARM.
- ♦ **Mupirocina:** de uso tópico. Similar al anterior.
- ♦ **Rifampicina:** antituberculoso. Actúa frente a bacterias Gram⁺
- ♦ **Fosfomicina:** amplio espectro.

TIPOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

PRUEBAS POR DIFUSIÓN: son pruebas cualitativas que se hacen en medio sólido. Los resultados se informan como:

Sensible Intermedio Resistente

Las pruebas por difusión son las más usadas en el laboratorio por su rapidez y sencillez. A pesar de ello también tienen sus inconvenientes:

- ♦ Falta de estandarización
- ♦ Mala conservación de los antibióticos

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA DIFUSIÓN EN MEDIO SÓLIDO

- Inocular caldo nutritivo (inóculos mas o menos denso). Incubar a 37°C durante 2-4 horas.

Necesitamos m.o que se encuentren en la fase de crecimiento exponencial, por eso solo incubamos de 2 a 4 horas.

- Ajustar al 0,5 de la escala de Mc Farland, que es la que normalmente se observa en las infecciones. Se puede ajustar hacia arriba,

añadiendo inóculo, o hacia abajo, añadiendo agua destilada estéril.

- Sembrar con la torunda una placa de Mueller–Hinton o, en el caso de Estreptococos en Agar Sangre. Usamos principalmente el Mueller–Hinton porque no contiene carbohidratos, en el que crece cualquier m.o y no produce variaciones morfológicas. También podemos usar Soja Trypticase.

Sumergimos la torunda en el inóculo al 0,5 y escurrimos el exceso rotándola en las paredes del tubo. Pasamos la torunda por toda la superficie de la placa y esperamos de 3 a 5 minutos para que se absorba el inóculo antes de colocar los discos.

- Colocar los discos antimicrobianos (15 mm de distancia). Se pueden colocar de forma manual, uno por uno, presionando contra el agar un poco. Nunca se levantarán una vez puestos y se deberán colocar separados uno de otro y del borde de la placa (4–6 discos por placa). Existen unos dispensadores que de una sola vez coloca todos los discos.
- Incubar 18–24 horas.
- Leer los resultados. Medimos el halo de inhibición (diámetro) y vamos a las tablas donde comparamos los resultados.

PRUEBAS POR DILUCIÓN:

informan sobre dos aspectos:

CMI: Mínima Concentración de Inhibición. Es la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias a una concentración de 10^5 bact./ mL.

CMB: Concentración Mínima Bactericida. Es la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de matar a 10^5 bact./ mL.

CMA: mínima concentración de antimicrobiano que *in vitro* es capaz de producir alteraciones morfológicas y/o estructurales (menos importante).

Los métodos por dilución pueden ser en medio sólido y en medio líquido.

En Medio Líquido:

Macrométodo: se utiliza un Mueller–Hinton. Preparamos una serie de tubos estériles con concentración decreciente en base 2 (es decir, 1/2) del antimicrobiano. Inoculamos con un inóculo que contenga 5×10^5 UFC/ mL e incubamos a 35–37°C durante 18 horas.

Los Resultados se expresan como CMI o mínima concentración de antimicrobiano donde se observa crecimiento visible a simple vista.

Micrométodo: Utilizamos placas con múltiples pocillos. Pondremos 100 L de caldo con antimicrobiano y 1–5 L de inóculo.

En Medio Sólido: sustituimos el caldo por un medio sólido, pero el procedimiento es igual que el anterior.

Fuentes de error de los métodos por dilución:

- ♦ Medio: mal estado, volumen inadecuado
- ♦ Antibiótico: mala conservación, retraso en la inoculación
- ♦ Microorganismo: exceso de inóculo, cultivos viejos, inóculo con más de un m.o, retraso en la siembra, deficiencias en las condiciones de incubación...

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

- ◇ Criterio de poblaciones o ecológico: compara la susceptibilidad que presenta el m.o con respecto al resto de m.o de su especie.
- ◇ Criterio farmacológico: tiene en cuenta las propiedades farmacológicas del agente antimicrobiano ya que el objetivo final es que la CMI sea alcanzable en líquidos corporales.
- ◇ Criterio clínico: tiene en cuenta la experiencia diaria que se ha adquirido en el tratamiento de una determinada infección. Los resultados pueden ser:
 - Sensible: se puede tratar la infección a la dosis recomendada
 - Intermedio: dosis altas pero alcanzables
 - Resistente: en ningún caso el m.o se inhibe a concentraciones terapéuticas.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. TIPOS PRINCIPALES.

Alteraciones de la permeabilidad
tanto del m.o como del fármaco.

G+ G-

Sistema de bombeo acoplado
Proteína expulsa fármacos del

Al potencial de membrana: interior
celular:

- Proteína transportadora
- mecanismo acoplado al potencial
de membrana

- Una Porina -mediante energía
obtenida de la hidrólisis de ATP

- Proteína nexo entre las otras dos.

Alteraciones del blanco o diana:
receptores específicos.

Inactivación enzimática: -
lactamasas y otras enzimas
(adenilasas, fosforilasas)

Mecanismo intercambio genético:
transformación, conjugación y
trasducción.