




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.



BACTERIOLOGÍA CLÍNICA

MANUAL DE



LABORATORIO

Alumno(a): _____ Hora: _____

Maestro(a): _____

2018 - 2019

Aprobado por el H. Consejo Técnico Consultivo. 20 de septiembre de 2013

MANUAL ELABORADO POR:

ME. Juana Tovar Oviedo

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

COLABORADORES:

Dra. María Eugenia Torre Bouscoulet

QFB. Gloria Alejandra Martínez Tovar

QFB. Andrés Flores Santos

2018 - 2019



EXUDADO NASAL

PRÁCTICA 5

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Biota normal y patógena de nasofaringe.
2. Toma, manejo y transporte de la muestra.
3. Generalidades y patogenia específica del género *Haemophilus*.
4. Requerimientos nutricionales y atmosféricos del género *Haemophilus*.
5. Fundamentos de las pruebas de identificación para *Haemophilus sp*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pneumoniae* (catalasa, oxidasa, prueba para requerimientos de factores X, V; prueba de optoquina).

OBJETIVO GENERAL

Que el alumno se familiarice con la biota normal de nasofaringe a través de la recuperación de agentes microbiológicos a partir de un exudado nasal, analizando la morfología colonial macroscópica y microscópica, así como el resultado de las pruebas de identificación realizadas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar colonias sugestivas de *Haemophilus influenzae*.
- Realizar el aislamiento primario de *Haemophilus influenzae* empleando la técnica de la estría de estafilococos.
- Descartar bacterias patógenas en nasofaringe.

INTRODUCCIÓN

La sinusitis, trastorno inflamatorio de los senos paranasales, puede clasificarse como aguda o crónica, siendo la mayoría de los casos de sinusitis bacteriana aguda secundarios a una infección vírica de las vías respiratorias superiores o una inflamación alérgica, por lo que suele producirse inflamación nasal y algunos expertos se refieren a esto como rinosinusitis.

Para conocer la microbiología de la sinusitis aguda hay que prestar mucha atención al método de obtención de las muestras. La cavidad nasal esta colonizada por diversos agentes de la biota respiratoria, que puede contaminar fácilmente el material obtenido de los senos paranasales.

En estudios, en los cuales se prestó especial atención a disminuir la contaminación y analizando los resultados de forma cuantitativa, se aisló con mayor frecuencia *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus*.

Los miembros del género *Haemophilus* son un grupo de bacterias (cocobacilos pequeños) Gram negativo, pleomórficos, que requieren factores de crecimiento presentes en la sangre para su aislamiento, son anaerobios facultativos, crecen mejor en atmósfera con 5–10% de CO₂, las colonias en agar chocolate requieren 36-48 horas para desarrollar diámetros de 1 mm.

Haemophilus influenzae está distribuido mundialmente (reservorio el hombre), con prevalencia mayor de 2 meses a 3 años de edad; es poco común después de los 5 años de edad. En países en desarrollo mayormente en niños menores de 6 meses y en Estados Unidos en niños de 6-12 meses de edad.

Algunas especies de *Haemophilus* requieren factor X, que probablemente no sea una sola sustancia sino más bien un grupo de compuestos tetrapirrólicos termoestables, que son proporcionados por diversos pigmentos que contienen hierro (ej. hemina, hematina). Los compuestos del factor X se usan en la síntesis de catalasas, peroxidasas y el sistema de transporte de electrones de citocromos.

Otras especies de *Haemophilus* también pueden requerir del factor V [NAD, coenzima I o NADP, coenzima II]. El factor V es biosintetizado en gran cantidad por diversos microorganismos (ej. *S. aureus* y levaduras).

El *H. influenzae* depende de ambos factores V y X para desarrollar, *H. parainfluenzae* sólo depende del factor V, el *H. ducreyi* del factor X y el *H. parahemolyticus* requiere sólo el factor V pero es hemolítico.

Alrededor de las colonias de estafilococos (o de otros m.o.) las de *H. influenzae* crecen mucho más grandes “fenómeno de satelitismo”, (sugestivamente, si crece cerca es grupo a y si crece lejos es grupo b).

Las especies encontradas clínicamente en el hombre son: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parahemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *H. segnis*, *H. aegyptius*.

Mecanismo de transmisión de *H. influenzae*: por contacto con gotitas y secreciones nasofaríngeas durante el período infectante. El sitio de entrada con mayor frecuencia es la nasofaringe. El periodo de incubación se desconoce y probablemente sea de dos a cuatro días. La enfermedad deja de ser transmisible en

el término de 24 a 48 horas de haber iniciado el tratamiento eficaz con antibiótico, entre los que son empleados son: ampicilina, cloramfenicol, rifampicina y ceftriaxona u otra cefalosporina de 3ª generación, etc.).

El factor mayor de virulencia es el polisacárido capsular. El *H. influenzae* tipo b, es un patógeno importante para el humano; se encuentra sobre las mucosas del aparato respiratorio superior en el hombre. Es causa importante de meningitis en niños y en ocasión produce infecciones del aparato respiratorio en niños y adultos.

Las infecciones más comunes producidas por *Haemophilus influenzae* serotipo b (biotipos: I, II, III, IV, V, VI) son: meningitis bacteriana, epiglotitis, pericarditis, neumonía, artritis séptica, osteomielitis, celulitis facial e infecciones del tracto urinario.

A continuación se describen algunas de las infecciones por *Haemophilus*:

Meningitis: Los causantes más frecuentes son *H. influenzae* y *N. meningitidis*. Su manifestación clínica son signos meníngeos, por lo general comienzo insidioso, fiebre, convulsiones; habitualmente en niños de 1 mes a 2 años de edad.

Bacteremia: Es una manifestación temprana y frecuente de infección aguda por *H. influenzae*. Algunos niños se presentan con bacteremia primaria sin meningitis.

Epiglotitis: El causante más frecuente es *H. influenzae* tipo b, se manifiesta por un rápido comienzo y progresión de odinofagia, disfagia y obstrucción de aérea alta; la epiglotitis está roja y tumefacta.

Bronquitis crónica: El causante más frecuente es *H. influenzae* se manifiesta por tos no productiva persistente, cibilancias y disnea, la enfermedad habitualmente es crónica con exacerbaciones purulentas periódicas.

Laringotraqueobronquitis obstructiva aguda: Infección potencialmente seria, causada por *H. influenzae*.

Conjuntivitis: Los causantes más frecuentes *H. aegyptius*, relacionado con *H. influenzae* biotipo III, caracterizada por una secreción conjuntival mucopurulenta. Se disemina por secreciones infectadas en toallas, manos y otros fomites.

Endocarditis: Causantes más frecuentes son *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parainfluenzae* y *H. influenzae*. Se manifiesta por escalofríos, fiebre en picos, leucocitosis, más comúnmente se afectan las válvulas mitral y aorta.

Chancroide: El causante más común es *H. ducreyi*. Es una enfermedad de transmisión sexual caracterizada por lesiones genitales ulcerosas y dolorosas y ganglios linfáticos inguinales agrandados que supuran.

Diagnóstico de las infecciones producidas por *Haemophilus*:

Las especies de *Haemophilus* recuperadas de muestras humanas a través de cultivo en agar chocolate o técnica de la estría de estafilococos se identifican en el Laboratorio Clínico a través de la tinción de Gram y requerimiento de factores X y V, reacciones hemolíticas en agar sangre de carnero, producción de catalasa y oxidasa y mediante la utilización de diversas pruebas de rutina, que incluyen producción de indol, actividad de ureasa y ornitina descarboxilasa y fermentación de hidratos de carbono. Cepas tipificables encapsuladas; cepas no tipificables no encapsuladas.

Identificación de *Haemophilus influenzae*: Se puede llevar a cabo por medio de la detección de antígeno:

- Coaglutinación
- Aglutinación con partículas de látex
- Inmunoensayo enzimático
- Radioinmunoensayo
- Inmunofluorescencia indirecta

También se puede identificar mediante los requerimientos de factores X y V, prueba de la porfirina, pruebas bioquímicas, sondas de DNA, o bien se pueden emplear pruebas serológicas como el método de serotipificación o la detección de anticuerpos.

| MATERIAL | REACTIVOS | MEDIOS DE CULTIVO |
|--|----------------------------|----------------------------------|
| Hisopos estériles con cánula | Cristal violeta | ASC al 5% |
| | Lugol | Agar chocolate no sobrecalentado |
| Portaobjetos | Alcohol-acetona | |
| Charolas de tinción | Safranina | |
| Puente de tinción | Agua destilada | |
| Asas de siembra | Para la prueba de catalasa | |
| Mechero Bunsen | Para la prueba de oxidasa | |
| Cajas de Petri | Solución salina estéril | |
| Gradillas metálicas | | |
| Cubre bocas | | |
| Guantes de látex | | |
| *Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | |

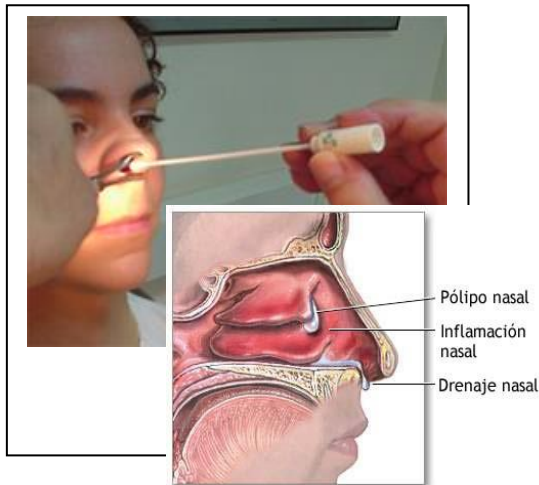
DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1ª SESIÓN

Toma de muestra.

La recolección de la muestra de exudado nasal tiene una duración no mayor a 15 segundos, sin embargo para algunos pacientes puede ser molesta y provocar alguna incomodidad; por lo que es importante que el personal encargado de tomar la muestra conozca las molestias mínimas que se pueden presentar al momento de la recolección como irritación de la mucosa nasal.

Observe con cuidado la figura 1 que a continuación se muestra anotando en las líneas de la derecha las características que presente el paciente ej. Secreción ausente, regular o abundante, transparente, densa, con sangrado, verde, etc.



OBSERVACIONES

Figura 1. Anatomía de cavidad nasal.
Técnica de toma de muestra para exudado nasal.

PROCEDIMIENTO:

- ❖ Rotule sus medios de cultivo y/o medios de transporte con los datos del paciente, tipo de muestra, fecha de recolección, etc.
- ❖ Explicar al paciente el procedimiento de la toma de muestra, indicándole las posibles molestias que puede llegar a sentir.
- ❖ Pedirle al paciente que incline ligeramente la cabeza hacia atrás.
- ❖ Realizar una revisión del área nasal, si hubiese alguna lesión la muestra deberá de ser recolectada del borde de la lesión.
- ❖ Humedezca ligeramente el hisopo con solución salina estéril.
- ❖ Introduzca cuidadosamente el hisopo dentro de la fosa nasal, aproximadamente 1 cm.
- ❖ Tome la muestra firmemente dentro de la fosa nasal, rotando el hisopo y dejándolo en un mismo sitio por 10 segundos aproximadamente.

- ❖ Retire el hisopo.
 - Inocule los medios que utilizará para el aislamiento de agentes etiológicos (agar chocolate y agar sangre de carnero al 5%).
 - Inserte el hisopo en el contenedor de transporte y procese lo antes posible.

CULTIVO DE LA MUESTRA:

- ❖ Una vez inoculado los medios de cultivo (y en área estéril), con ayuda del asa estéril realice la siembra por medio de técnica de agotamiento.
- ❖ Incubar en la estufa bacteriológica en las condiciones necesarias para el cultivo de microorganismos fastidiosos.
- ❖ Posteriormente realice la tinción de Gram a partir de la muestra obtenida y observe al microscopio.

HOJA DE DATOS

| IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE | | |
|------------------------------------|--------------------|-------|
| Nombre: | Sexo: | Edad: |
| Observaciones: | | |
| Diagnóstico presuntivo: | | |
| Procedencia: | Tel: | |
| DATOS DEL ESPÉCIMEN | | |
| Espécimen: | Tipo: | |
| Fecha de la toma: | Hora de colección: | |
| Aspecto de la muestra: | | |
| Tinción de Gram: | | |
| Otros estudios: | | |
| AISLAMIENTO | | |
| Medio(s) empleados: | | |
| Condiciones de incubación: | | |
| Morfología colonial: | | |
| Tinción de Gram: | | |
| Se aisló: | | |

Para realizar la revisión del desarrollo de los microorganismos en los medios de cultivo, es necesario que el alumno tenga conocimiento de cuál es la biota normal y la biota patógena para el sitio analizado.

BIOTA NATIVA

BIOTA PATÓGENA

2ª Sesión

Revisar el desarrollo bacteriano en los diferentes medios de cultivo, observando y seleccionando aquellas colonias sugestivas de microorganismos patógenos de cada uno de los medios.

Realizar tinción de Gram a las colonias seleccionadas y determinar las pruebas de identificación a realizar tales como: catalasa, técnica de siembra en estría para estafilococos (prueba de satelitismo), fig. 2; prueba de optoquina, fig. 3; de acuerdo al agente aislado (Revisar diagrama de trabajo correspondiente).

Técnica de siembra en estría para estafilococos.

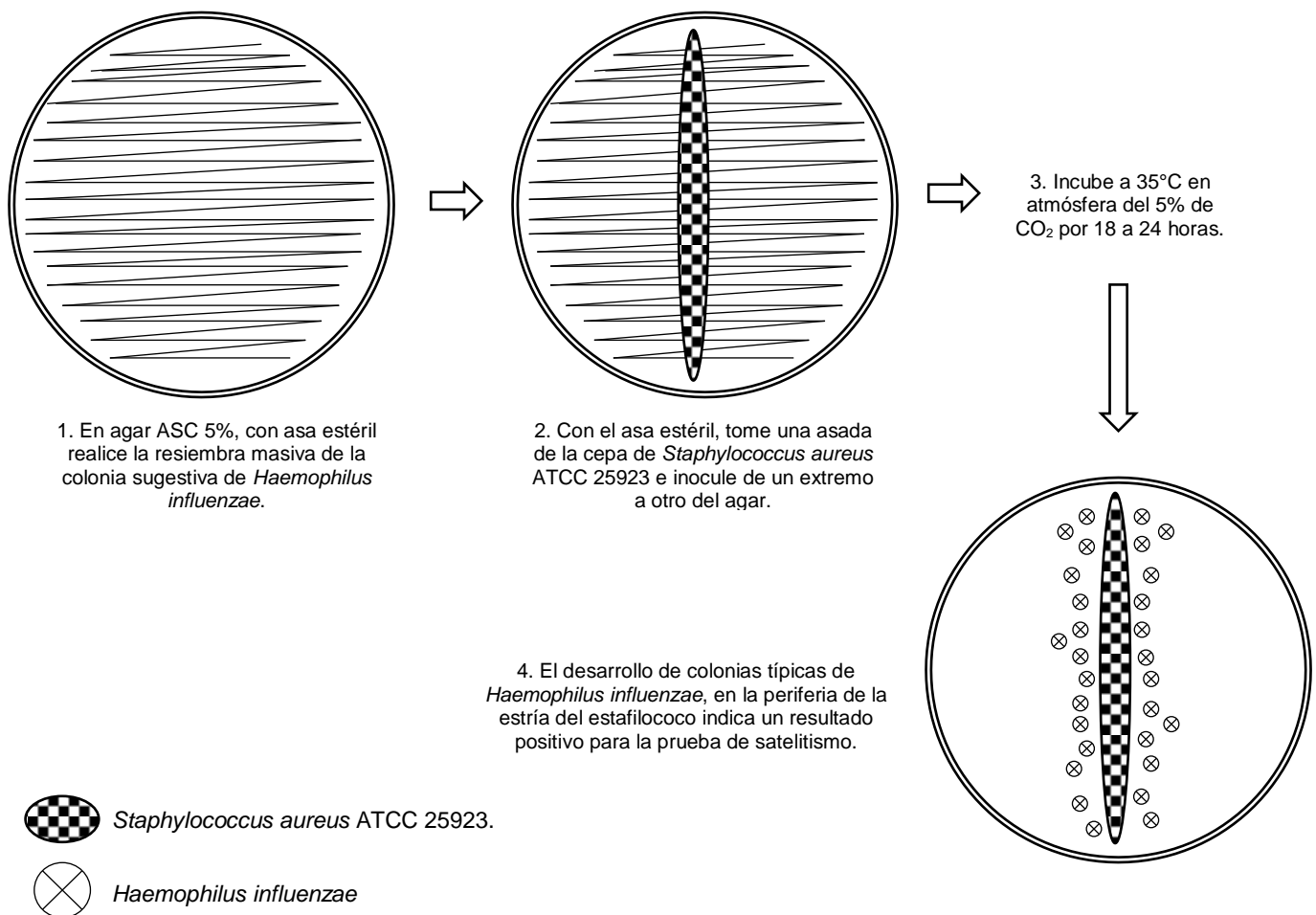


Fig. 2. Técnica de siembra en estría para estafilococos o “fenómeno de satelitismo”.

El fenómeno del satelitismo de *H. Influenzae* se presenta cuando *S. aureus* suministra el factor V (NAD) que se difunde en el medio de cultivo, a su vez la sangre del medio proporciona el factor X.

Prueba de Optoquina

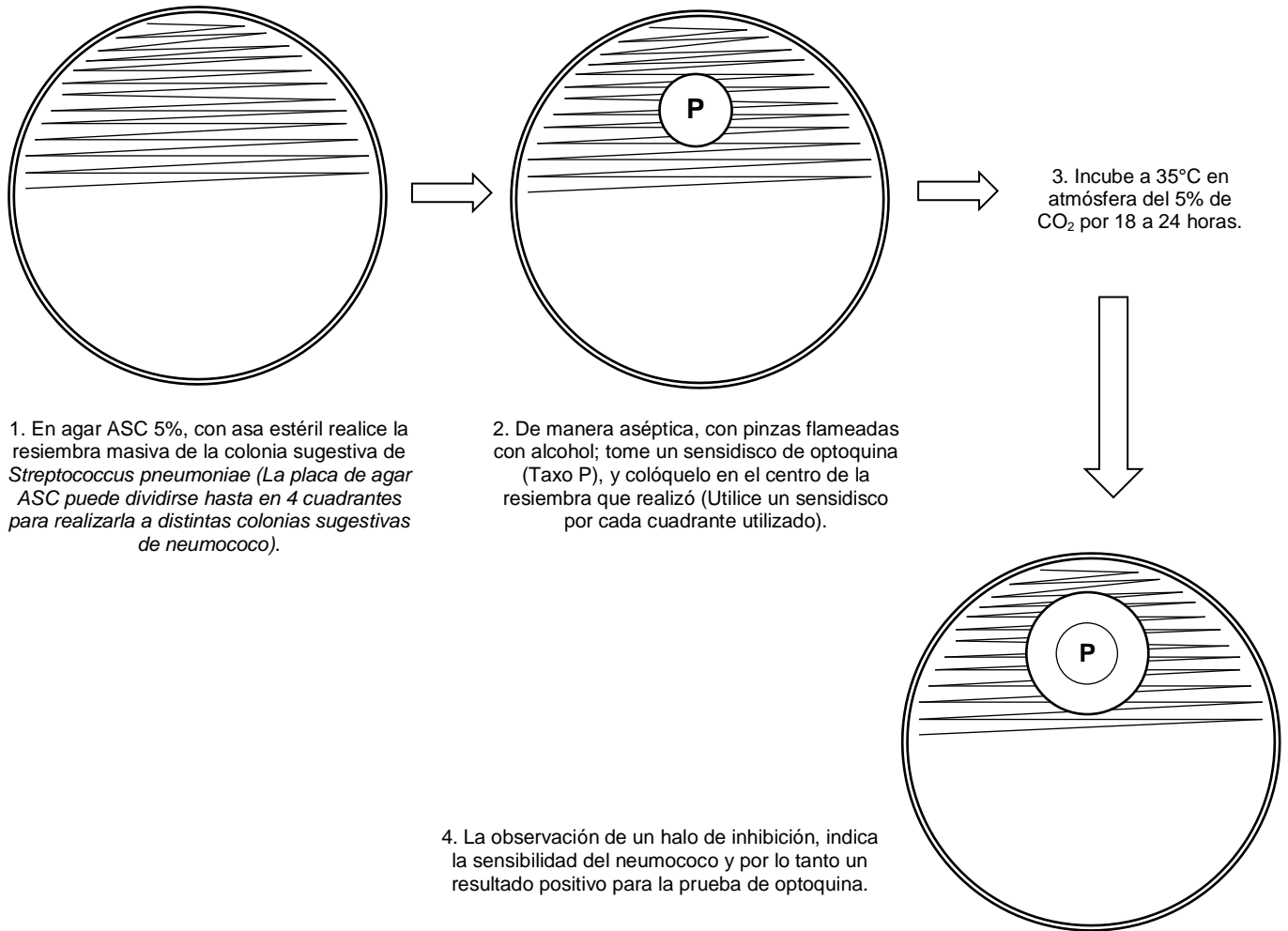


Fig. 3. Diagrama de realización prueba de Optoquina.

3ª. SESIÓN

Realizar la Interpretación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de identificación y/o sensibilidad realizadas.

4ª. SESIÓN

Discusión de resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook.3rd ed, Lynne S. Garcia, 2010 ASM Press, American Society for Microbiology.
2. Baron, E., Cassel, G., Duffy, L., 1993. **American Society for Microbiology.** Laboratory Diagnosis of Female Genital Tract Infections, CUMITECH. 17A:1-23.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.
CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



BIBLIOGRAFÍA

1. Baron, E., Cassel, G., Duffy, L., 1993. **American Society for Microbiology**. Laboratory Diagnosis of Female Genital Tract Infections, CUMITECH. 17A:1-23.
2. Calderón J. 1997. **Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos**. México.
3. Chusid, M., J., R.W. Perzigian, W. M. 1999. **Guía para el manejo de especímenes clínicos en microbiología**. 2ª. Edición. Ed. ASM PRESS Washington, D.C.
4. Díaz R., Gamazo C y López-Goñi I. 1995. **Manual Práctico de Microbiología**. España: Ed. Masson, S. A.
5. Dunne, W., Nolte F., Wilson M. 1997. **American Society for Mycrobiology**. Blood cultures III. CUMITECH. 1B: 1-21.
6. Jawetz., Melnick y Adelberg. 1998. **Microbiología Médica**. México: Ed. El Manual Moderno.
7. Koneman E., Allen S., Dowell V.R., Janda W., Sommers H y Winn W. 2013. 6ª. Ed. **Diagnóstico microbiológico**. México: Editorial Médica panamericana.
8. MacFadin J. 1984. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. México: Ed. Médica Panamericana. S.A.
9. Mandell G., Bennett J., Dolin R. 1997. **Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica**. Ed. Médica Panamericana. 1214-1228.
10. Murray P., Drew W., Kobayashi G y Thompson J. 2009. **Microbiología Médica**. España: 6ª. Ed. Mosby Year Book.
11. Ponce de León S., Macías E., Molina J y Avila C. 2000. **Guía Práctica Infecciones Intra-Hospitalarias**. Ed. Especial CEFROM: 127-130, 101-114, 115-127.
12. Voet D., Voet J.G. y Pratt C. W. 2007. **Fundamentos de bioquímica, la vida a nivel molecular**. Sección 3-5 paginas 62-65.
13. NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
14. NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis

<http://www.cdc.gov/od/ohs>

<http://www.seimc.org/protocolos/>