**CLASE:** 9-10

 **SUMARIO:**

* Urocultivo. Algoritmo de trabajo. Interpretación preliminar de los resultados.
* Disbacteriosis. Gram en heces. Coprocultivo

**UROCULTIVO**

La obtención de muestras de orina para estudio microbiológico (urocultivo) se realiza con fines de aislamiento e identificación de bacterias causales de sepsis urinaria y posterior realización del antibiograma.

La orina es el producto biológico del que con mayor frecuencia se solicitan cultivos y plantea además serios problemas en lo que respecta a:

* Obtención de la muestra.
* Transporte de la misma.
* Técnicas de cultivo
* Interpretación de los resultados.

La mayoría de estas infecciones son causadas por bacterias intestinales, cerca del 80% por *Escherichia coli*. En cerca del 10% pueden encontrarse 2 microorganismos e intervenir ambos en el proceso morboso. La presencia de tres o más microorganismos en un cultivo de orina debe hacer pensar en una mala toma de muestra.

¿Cómo se recolecta la muestra de orina para el estudio microbiológico?

1. Micción espontánea: La primera orina de la mañana es la más apta, pero en el caso de recoger la muestra en el curso del día, se recomienda esperar por lo menos 4 horas después de la última micción. Recoger de modo aséptico (previo lavado detallado y exhaustivo de los genitales) la segunda porción de la orina.

**Toma de la muestra:**

1. Lavar los genitales externos con agua corriente y jabón.
2. Enjuagar con agua hervida yodada (Hervir la noche anterior un litro de agua y añadirle 2-3 gotas de yodo)
3. No secar
4. Comenzar a orinar y tomar del chorro medio una pequeña porción. En este momento se destapa el frasco (ámbar, tipo citrogal) que previamente ha sido esterilizado en autoclave, se vuelve a tapar rápidamente y se le coloca la retapa de papel.
5. Llevar lo antes posible la muestra al laboratorio (preferiblemente no demorar más de una hora),

Existen criterios de diferentes autores que excluyen el aseo previo en el varón, sólo tener en cuenta la toma de muestra del chorro medio, en el caso de la hembra ocurre todo lo contrario, esta es obligatoria pero con la separación manual de los grandes labios para evitar contaminación de la orina.

* En condiciones ideales, la muestra de orina debe sembrarse de inmediato, de lo contrario se aconseja guardar en nevera hasta el momento de la siembra para evitar una alteración en el recuento.

**DIAGNÓSTICO DE CERTEZA DE LA INFECCIÓN URINARIA.**

* Urocultivo cuantitativo (Normas Nacionales de Microbiología, 1971).
* Empleando pipeta Eppendorf con puntas estériles, inocular 5 μL (0,005 mL) sobre la superficie de una placa con medio CLED, extendiéndose el inóculo con una espátula de Drigalski previamente embebida en alcohol y flameada.
* Incubar a 37°C durante 18-24 horas.
* Lectura:

Se divide la placa en 4 y se escoge el cuadrante promedio (en número de colonias) y se cuentan las colonias que existen en el mismo, estas se multiplican por 4 y por 200, donde: 4 es igual al # de cuadrantes y 200 es el factor de conversión de mililitros a microlitros.

La interpretación de ese conteo es el siguiente:

**NEGATIVOS:**

* No crecimiento bacteriano
* < 10 000 colonias

**DUDOSO**

* >10 000 y <100 000 colonias (se trabaja y se informa el microorganismo con su sensibilidad y resistencia a las drogas antimicrobianas)

**POSITIVO:**

* > 100 000 colonias (se trabaja y se informa el microorganismo con su sensibilidad y resistencia a las drogas antimicrobianas)

Cuando existen **dos tipos** de colonias se trabajan las dos por separado hasta el final y se informan los microorganismos con su sensibilidad y resistencia a las drogas antimicrobianas.

Cuando existen **tres tipos** de colonia se informa **MUESTRA CONTAMINADA** y se manda a repetir el examen.

* Identificación:
* Coloración de Gram a las colonias.
* Pruebas bioquímicas ó fisiológicas.
* Pruebas serológicas ó antigénicas.
* Prueba de susceptibilidad a las drogas antimicrobianas:
* Bauer-Kirby.
* DIRAMIC.
* Dilución
* Informe final:
1. Positivo.
* Nombre del Microorganismo.
* # de ufc/mL
* Sensibilidad y resistencia a las drogas antimicrobianas.
1. < 10 000 ufc/mL.
2. Muestra contaminada.
3. No crecimiento bacteriano.

Todo con fecha y firma del técnico.

**Disbacteriosis. Gram en heces. Coprocultivo**

El tracto gastrointestinal contiene una microbiota normal bacteriana muy amplia y diversa. Normalmente el intestino delgado contiene una microbiota escasa, pero conforme se alcanza el íleon distal, los recuentos se aproximan a 106 - 107 bacterias/g de heces. El colon es el mayor reservorio de microorganismos del cuerpo humano, con conteos de 1012 bacterias/g de materia fecal recién emitida. En esta porción existe un predominio de bacterias Gram. negativas (60 %) sobre las Gram. positivas (40 %)*.*Cuando este equilibrio se altera y se invierte la proporción ocurre una **disbacteriosis.**

La disbacteriosis se diagnóstica mediante el examen directo de heces coloreado por el método de Gram. para conocer la relación de bacterias Gram. negativas / Gram. positivas en el tracto intestinal Terminal.

**Examen directo de heces mediante coloración de Gram:**

* Toma con un hisopo de algodón una porción de la muestra.
* Realizar frotis sobre una lámina portaobjetos.
* Colorear con la tinción de Gram
* Observar al microscopio óptico con lente objetivo de 100X
* Realizar el calculo porcentual
* Informar los resultados

Las enterobacterias incluye bacterias que habitan de forma normal en el intestino de los seres humanos y otras que habitan otros hospederos y ambientes como en el suelo, agua, alimentos, etc. Incluye especies de diversos géneros como: *Escherichia coli, Salmonella spp, Shigella spp,* entre otras. Las bacterias mencionadas son la principal causa de IDA bacterianas. La materia fecal es la muestra común y típica que se usa para investigar la presencia de microorganismos patógenos en el intestino. Las bacterias entéricas no se pueden diferenciar e identificar mediante examen directo, y debe recurrirse al cultivo en medios especiales para el diagnóstico de laboratorio. Al cultivo de las heces se denomina **coprocultivo.**

Como ya habíamos visto el análisis de las heces se realizan para el diagnóstico de parásitos entéricos y con el fin de aislar e identificar bacterias enteropatógenas, para conocer la relación de bacterias gramnegativas/ grampositivas en el tracto intestinal terminal.

Este se realiza con el objetivo de determinar la presencia de bacterias enteropatógenas (Salmonella sp, Shigella sp, Yersinia enterocolítica y Vibrionaceas, en casos especiales Vibrium cholerae) en muestras de heces fecales.

**Muestra de heces para estudio bacteriológico o COPROCULTIVO**

**Requisitos para la recolección de la muestra:**

Las muestras para coprocultivo, deberán tomarse antes de la administración de antimicrobianos o agentes antidiarréicos. Es conveniente también evitar los compuestos habitualmente utilizados para estudios radiológicos digestivos (bario, bismuto). No son válidas las muestras contaminadas con orina.

**Recolección de la muestra**

Es recomendable que las muestras de heces sean obtenidas por defecación espontánea recogida en recipiente estéril de boca ancha y cierre hermético. Si son heces formadas o pastosas se recogerán al menos 5 gramos y de ser heces líquidas bastará con 5 ó 10 ml.

La muestra de heces también se puede se puede obtener por hisopado rectal, introduciendo un aplicador por el ano profundamente garantizando la recogida de las heces. Este proceder es recomendable para niños pequeños y para la recuperación de *Shigella dysenteriae* de las paredes réctales.

**Conservación y transporte:**

En caso que la muestra no se vaya a procesar en el plazo de 1 ó 2 horas después de su emisión se pueden preservar a 4 ºC en sistema de transporte para bacterias, como el medio de transporte semisólido Cary-Blair o el buffer salino de glicerol , en los cuales se introducirá un hisopo de algodón estéril con heces cuidando de que la punta quede cubierta por el medio de cultivo, garantizando la viabilidad de patógenos intestinales.

Las muestras deben ser sembradas inmediatamente siempre que sea posible ya que hay microorganismos que son sensibles al pH ácido y cambios de temperatura como Shigella.

Para el coprocultivo se utilizan medios diferenciales como el Agar Mc Conkey, medios selectivos como el agar SS y caldo de enriquecimiento como el selenito.

**Procedimiento:**

* Con el asa estéril se toma una alícuota de la muestra (seleccionar las porciones que contengan pus, sangre o moco) y se siembra por estría en una placa que contiene Agar Mc Conkey.
* Se realiza el mismo procedimiento en una placa que contiene Agar SS (Salmonella-Shigella).
* Se toma aproximadamente 1 gramo de heces y se siembra en un tubo que contiene 10 ml. de caldo de enriquecimiento Selenito de Sodio.
* Se incuba todo a 37oC por 18 a 24 horas en aerobiosis.
* A las 18 o 24 se hace una resiembra del tubo con caldo selenito por asada a medio sólido Agar SS y se incuba en igualdad de condiciones anteriores.
* Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procederá al aislamiento e identificación de los agentes causales.
* El crecimiento de las colonias características en los medios selectivos, que la diferencian de otras enterobacterias comunes presentes en las heces fecales, permiten su aislamiento e identificación por medio de pruebas bioquímicas y serológicas.
* Si se trata de una muestra para la identificación de Vibrios y necesita ser transportada utilizar medio de transporte de Cary Blair .

**Lectura e interpretación:**

Selección de las colonias características: fermentadoras de la lactosa (rojas) y no fermentadoras de la lactosa (blancas).

 Si aparecen colonias fermentadoras de la lactosa se hará el estudio buscando m.o. del género Escherichia.

A los no fermentadores se les investigarán patógenos de los géneros Salmonella, Shigella ó de la familia Vibrionácea.

Para investigación del género Campylobacter se hará siembras en medios enriquecidos y especiales condiciones de incubación.

Si producto de la lectura obtenemos colonias fermentadoras de la lactosa (rojas) procederemos a investigar mediante pruebas bioquímicas al género Escherichia y sus variantes patogénicas como (ECEI), (ECEP) y (ECEH).

**Informe de resultados**

1. • Se informarán de inmediato de aislarse las cepas de enteropatógenos descritos. Salmonella typhi, Shigella dysenteriae o Vibrium cholerae. En todos los casos es necesario su envío a los centros de referencia, para Salmonella-Shigella CPHE y de sospecharse V. Cholerae Instituto de Medicina Tropical “IPK.” Si no se aíslan bacterias patógenas se informa como no se obtuvo crecimiento de enterobacterias patógenas.

**BIBLIOGRAFÍA:**

* + Moran Villatoro, Luis. Obtención de muestras de calidad analítica. Editorial Ciencias Médicas.
	+ Jorge Suardíaz. Celso Cruz. Ariel Colina. Laboratorio Clínico. Editorial Ciencias Médicas.
	+ Procedimientos técnicos en Microbiología Clínica. 2004. Digitalizado.

**ANEXO 1. MARCHA TECNICA UROCULTIVO.**

**Sembrar 0,005 mL (5 μL) de orina en medio CLED, Agar sangre y Agar Mc Conkey**

**Estriar con espátula de Drigalski**

**Incubar en aerobiosis a 35-37oC durante 18-24 horas.**

**Realizar lectura.**

 **POSIBLES RESULTADOS.**

**A B C D**

**ANTIBIOGRAMA**

**Bauer-Kirby**

**Pruebas serológicas**

**Pruebas Bioquímicas**

**COLORACIÓN DE GRAM:**

**Contaminada.**

**REPETIR**

**Negativo**

**>100 000 ufc/mL**

**Entre 10 000 y 100 000 ufc/mL**

**3 ó más tipos de colonias**

**< 10 000 ufc/mL**

**ANEXO 2. MARCHA TÉCNICA COPROCULTIVO: IDA**

**COPROCULTIVO.**

**SALMONELLA Y SHIGELLA**

 **CALDO SELENITO**

**DAR PASE A AGAR SS**

**INCUBAR A 37°C DURANTE 12-18 HORAS**

**INCUBAR A 37 °C DURANTE 18-24 HORAS.**

**KLIGLER Y LIA**

**Picar colonias blancas transparentes con o sin SH2**

**INCUBAR A 37 °C DURANTE 18-24 HORAS**

**IMÁGENES DE SALMONELLA IMÁGENES DE SHIGELLA**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Gluc*** | ***Lact*** | ***Gas*** | ***SH2*** | ***LIA*** |  | ***Gluc*** | ***Lact*** | ***Gas*** | ***SH2*** | ***LIA*** |
| **+** | **-** | **+** | **+** | **+** |  | **+** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **+** | **-** | **+** | **-** | **+** |  |  |  |  |  |  |
| **+** | **-** | **-** | **-** | **+** |  |  |  |  |  |  |