**CLASE:** 11-12

 **SUMARIO:**

* Procedimientos técnicos que se realizan en el estudio de los exudados faríngeos, nasal, ótico, conjuntival, y el líquido cefalorraquídeo.

**Exudado Faríngeo.**

--- **Toma de Muestra:** Se inclina la cabeza del paciente hacia atrás y se ilumina bien la garganta. Se empuja la lengua hacia debajo, utilizando un depresor, de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta. Se frota el hiposo de arriba abajo contra la parte posterior de la garganta y contra cualquier mancha blanca que se encuentre en la zona de las amígdalas. Deben evitarse la lengua y las mejillas así como la contaminación abundante del hisopo con la saliva ya que se ha observado la inhibición competitiva de la proliferación de los estreptococos del grupo A por la acción de los microorganismos orales presentes en la saliva.

--- **Requisitos:** El paciente debe realizarse aseo bucal de la forma habitual, cuidando de no realizar gargarismos, no debe desayunar para así evitar el arrastre de los posibles patógenos, no tomar terapia antimicrobiana.

--- **Conservación y transporte:** En caso de no poder inocularse directamente en el medo de cultivo indicado, entonces se deberá inocular en medio de transporte adecuado (stuart transport).

--- **Siembra:** Tanto para el exudado nasal como para el farìngeo debe utilizarse como medio de cultivo agar sangre, siendo esta de carnero, ya que la misma no permite el crecimiento de Haemophilus haemolíticus que tiende a confundirse con el Estreptococo β hemolítico. La concentración debe ser del 5%. La placa debe tener alrededor de 4 mm de altura. Al realizarse la siembra se debe descargar el hisopo sobre un sexto de la placa, rotando el mismo, para que toda la superficie del hisopo entre en contacto con el agar. Se estría la superficie de la placa con un asa de nicrón esterilizada con el objetivo de obtener colonias aisladas. Es de gran importancia que se le hagan picaduras oblicuas al agar ya que esto permite el crecimiento de las bacterias debajo de la superficie del mismo en condiciones anaeróbicas.

La lectura debe de realizarse con ayuda de un estereoscopio, los gérmenes patógenos que buscamos son:

Estreptococos β hemolíticos, Streptococcus pneumoniae (en proporción), Enterococcus spp, Haemophillus influenzae, Estafilococos, Branhamella catarrhalis, Gérmenes Gram negativos (en proporción)

Ante la sospecha de que la colonia que estamos observando, por su morfología, pertenece a uno de los patógenos que buscamos lo primero que debemos realizar es una tinción de Gram.

--- **Incubación:** Las placas se incuban durante 24 horas a 37oC, en condiciones de aerobiosis. Las mismas se colocan de forma invertida con el objetivo de impedir la acumulación de agua condensada en la superficie de la placa.

**Modo de informar los resultados obtenidos en el laboratorio:**

* Negativo: No se obtuvo crecimiento bacteriano o Microbiota Normal.
* Positivo: nombre del microorganismo y el resultado del antibiograma.
* Contaminado: si se produjo contaminación de los medios que impide detectar la presencia de microorganismo o lograr su correcta identificación

**Exudado nasal**

--- **Toma de Muestra:** El hisopo puede humedecerse con agua estéril o solución salina antes de introducirlo en la nariz del paciente. La punta de la nariz se levanta con una mano y el hisopo se introduce suavemente a lo largo del piso de la cavidad nasal, por debajo del cornete mediano, hasta llegar a la pared farìngea. No debe usarse la fuerza, si se encuentra alguna obstrucción el cultivo nasofaríngeo no debe tomarse de ese lado. En niños no introducir el hisopo profundamente.

--- **Requisitos:** El paciente no debe tomar terapia antimicrobiana.

--- Conservación y transporte: En caso de no poder inocularse directamente en el medo de cultivo indicado, entonces se deberá inocular en medio de transporte adecuado (stuart transport).

--- **Siembra:** Tanto para el exudado nasal como para el farìngeo debe utilizarse como medio de cultivo agar sangre, siendo esta de carnero, ya que la misma no permite el crecimiento de Haemophilus haemolíticus que tiende a confundirse con el Estreptococo β hemolítico. La concentración debe ser del 5%. La placa debe tener alrededor de 4 mm de altura. Al realizarse la siembra se debe descargar el hisopo sobre un sexto de la placa, rotando el mismo, para que toda la superficie del hisopo entre en contacto con el agar. Se estría la superficie de la placa con un asa de nicrón esterilizada con el objetivo de obtener colonias aisladas. Es de gran importancia que se le hagan picaduras oblicuas al agar ya que esto permite el crecimiento de las bacterias debajo de la superficie del mismo en condiciones anaeróbicas.

**--- Incubación:** Las placas se incuban durante 24 horas a 37oC, en condiciones de aerobiosis. Las mismas se colocan de forma invertida con el objetivo de impedir la acumulación de agua condensada en la superficie de la placa.

**Modo de informar los resultados obtenidos en el laboratorio:**

* Negativo: No se obtuvo crecimiento bacteriano o Microbiota Normal.
* Positivo: nombre del microorganismo y el resultado del antibiograma.
* Contaminado: si se produjo contaminación de los medios que impide detectar la presencia de microorganismo o lograr su correcta identificación

**Exudado Conjuntival:**

El ojo es un órgano complejo con muchos sitios potenciales para la infección. Aunque las infecciones oculares son presentaciones relativamente frecuentes tanto en pacientes pediátricos como adultos, las muestras oculares representan un pequeño porcentaje del volumen diario visto en los laboratorios de Microbiología Clínica.

El ojo tiene mecanismos de defensa para proteger su superficie de los microorganismos, de ellos el más importante es el mecanismo de la lágrima, la cual baña constantemente su superficie. La conjuntiva y la córnea son lubricadas continuamente mediante la secreción mucosa conjuntival y el flujo continuo de secreciones provenientes de la glándula lacrimal. Cada pocos segundos, los párpados cubren la superficie conjuntival suavemente pero con una acción limpiadora enérgica. Además de ejercer esta acción de eliminar cualquier sustancia extraña, estas secreciones (lágrimas) contienen lisozima, entre otras sustancias antimicrobianas. De esta manera, los microorganismos que se depositan en esta superficie son tratados como si fueran partículas inanimadas y son barridos hacia la cavidad nasal a través de los conductos lacrimales.

Así pues, la posibilidad de iniciar una infección en esta zona es muy reducida excepto para aquellos microorganismos que tengan una habilidad especial para adherirse a la superficie conjuntival. Por otra parte, la conjuntiva puede verse afectada por pequeñas lesiones, ampliando la posibilidad de verse infectada, de la misma manera que la alteración de los mecanismos de limpieza debido a enfermedades que impliquen los párpados, las glándulas y conductos lacrimales.

--- **Toma de muestra:** Debe ocluirse el ojo con apósito estéril la noche antes de la toma de muestra (aunque hoy día se debate este aspecto de la toma de muestra y muchos obvian la oclusión del ojo). Tomar la muestra del fondo de saco conjuntival utilizando un hisopo de algodón estéril libre de sustancias tóxicas.

--- **Requisitos:** No se debe aplicar tratamiento local o sistémico al menos durante 72 horas antes del proceder, se deben ocluir ambos ojos con apósito estéril la noche antes, previo aseo con agua hervida. Algunos autores no recomiendan este paso.

--- **Conservación y Transporte:** Si no se inocula en los medios de cultivo en el momento de la toma de muestra, estas se enviarán al laboratorio en medios de transporte adecuados.

--- **Siembra:** Las muestras se inocularán en los medios necesarios para obtener el crecimiento de patógenos, tales como:

Agar sangre de carnero o caballo al 5% más gentamicina 5μg/mL, Agar chocolate con 300 μg/mL de bacitracina más suplemento y Agar Mc Conkey. El Agar Thayer-Martin se utiliza en el aislamiento de meningococos a partir de muestras con flora bacteriana acompañante (exudados nasofaríngeo, rectal, conjuntival). Para este propósito, se adicionan al medio de cultivo, antibióticos como vancomicina, nistatina y colistina (VCN). Al Thayer Martin se le añaden también, sustancias activas químicamente definidas que favorecen el crecimiento de gérmenes exigentes.

Examen directo: mediante la coloración de Gram de la secreción obtenida de la superficie conjuntival. Si se observa un número elevado de bacterias de apariencia uniforme u hongos sugiere infección.

--- Incubación: Se incubarán a 35-37°C, durante 24 horas, en atmósfera húmeda con 5% de CO2. Si al realizar la lectura no hay crecimiento se extenderá el período de incubación hasta 72 horas con lectura diaria.

**Modo de informar los resultados obtenidos en el laboratorio:**

* Negativo: No se obtuvo crecimiento bacteriano o Microbiota Normal.
* Positivo: nombre del microorganismo y el resultado del antibiograma.
* Contaminado: si se produjo contaminación de los medios que impide detectar la presencia de microorganismo o lograr su correcta identificación

**Exudado Ótico.**

Las infecciones del oído están extendidas en todo el mundo y en la actualidad constituyen una de las primeras causas de consulta médica y uno de los principales motivos de prescripción de antibióticos. A menudo se desarrollan en el oído externo y medio y son susceptibles de padecer otitis externa pacientes de todos los grupos de edades, pero las infecciones del oído medio son usualmente limitadas a niños menores de 10 años de edad, habitualmente precedidas por un episodio de infección de las vías respiratorias. Es un proceso muy común en la edad pediátrica y su importancia radica en que puede presentarse de forma recurrente y ocasionar una pérdida de la capacidad auditiva, con el consiguiente retraso escolar; asimismo, puede ser causa de meningitis bacteriana aguda. La otitis media puede clasificarse en serosa o supurativa crónica dependiendo de la presencia o no de perforación timpánica.

La infección del oído medio se produce por microorganismos que llegan de la nasofaringe por la tuba auditiva, allí se multiplican, aumentan la presión y la supuración desarrollada conlleva a serio malestar y fiebre. En algunos casos la membrana timpánica se rompe espontáneamente, resultando en la salida de microorganismos y pus hacia el oído externo.

El neumococo es el principal agente etiológico de la otitis media aguda bacteriana, causando algo más de la mitad de los casos, aunque también pueden causarla otros microorganismos.

|  |  |
| --- | --- |
| OIDO EXTERNO. | OIDO MEDIO. |
| Microorganismos patógenos más frecuentemente aislados. | Microbiota normal. | Microorganismos patógenos más frecuentemente aislados. | Microbiota normal. |
| Pseudomona aeruginosa.Staphylococcus aureus.Streptococcus pyogenes.Anaerobios.Bacilos entéricos Gram negativos. | Corynebacterium sp.(Difteroides) | Sreptococcus pneumoniae.Haemophyllus influenzae.M. catarrhalis.Sreptococcus pyogenes.Anaerobios | S. epidermidis. |

--- **Toma de muestra:**

**OIDO EXTERNO:**

Las muestras del oído externo para cultivo deben ser colectadas de manera tal que minimice la contaminación con la flora normal habitante del conducto auditivo externo (CAE). Se deben descartar los tapones de cerumen y de existir, la otorrea, utilizando alcohol al 70%. Luego se llevará ligeramente hacia atrás y arriba el pabellón de la oreja, tratando de horizontalizar el CAE. Se introduce el hisopo de algodón estéril, cuidando de no tocar la membrana timpánica y se rota friccionando las paredes inflamadas y colectando el material exudativo, sin tocar las secciones no inflamadas de la piel.

**OIDO MEDIO:** La colección de fluidos del oído medio por timpanocentesis debe desarrollada usando técnicas antisépticas para prevenir la contaminación de la muestra con microorganismos que colonizan el CAE (perforando la membrana timpánica o por aspiración con aguja del líquido del oído medio). La membrana timpánica y las paredes del CAE deben ser cuidadosamente desinfectadas con alcohol previo al procedimiento. Si la membrana timpánica se ha roto, el fluido remanente en el CAE puede ser absorbido con un hisopo.

**MASTOIDES:** Las muestras para cultivo en casos de mastoiditis se recogen con hisopos durante la cirugía y deben ser transportados al laboratorio en condiciones de anaerobiosis.

**--- Requisitos:** Se debe comprobar la ausencia total de tratamiento local o sistémico.

--- **Conservación y Transporte:** Las muestras procedentes del oído medio y externo se enviarán al laboratorio en medios de transporte adecuados, y deben procesarse lo más rápidamente posible.

--- **Siembra:** las muestras se inocularán en los medios necesarios para obtener el crecimiento de patógenos, tales como: Agar sangre de carnero o caballo al 5% más gentamicina 5μg/mL, Agar chocolate con 300 μg/mL de bacitracina más suplemento, Agar Mac Conkey, Agar Sabouraud y Caldo de enriquecimiento.

**Examen directo:** mediante la coloración de Gram de la secreción obtenida de la superficie inflamada del CAE puede realizarse un diagnóstico presuntivo de otitis externa. Si se observa un número elevado de bacterias de apariencia uniforme u hongos sugiere infección.

Detección directa de antígenos: la ventaja más importante de estos ensayos es que el resultado está disponible en minutos en lugar de días, lo cual proporciona poder instaurar tratamiento antibiótico rápidamente y evitar o disminuir las secuelas a los pacientes

**--- Incubación:** Los medios en placa (Agar sangre, Agar chocolate, Mac Conkey) se incubarán a 35°C, durante 24 horas, en atmósfera húmeda con 5% de CO2. Si al realizar la lectura no hay crecimiento se extenderá el período de incubación hasta 72 horas con lectura diaria.

El medio líquido se incubará durante 72horas a 35°C, realizando lectura diaria, después de lo cual se realiza coloración de Gram y resiembra en los medios de cultivo bacteriológicos antes mencionados.

El medio para hongos se incuba a temperatura ambiente durante 7 días.

**Modo de informar los resultados obtenidos en el laboratorio:**

* Negativo: No se obtuvo crecimiento bacteriano o Microbiota Normal.
* Positivo: nombre del microorganismo y el resultado del antibiograma.
* Contaminado: si se produjo contaminación de los medios que impide detectar la presencia de microorganismo o lograr su correcta identificación

**BIBLIOGRAFÍA:**

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