

Procedimientos Técnicos en Microbiología Clínica.

Faríngeos y Nasaes

EXUDADOS FARÍNGEOS Y NASALES:

Dr. Carlos M. Rodríguez Pérez.
Lic. Andrés Noya Cabaña.

Introducción:

Para conocer la existencia de algún germen patógeno alojado en la nasofaringe, lo más práctico sería realizar un exudado nasal y/o faríngeo. Los gérmenes normales en esa zona serían aquellos que pertenecen a la microbiota residente de la nariz y la garganta. Los microorganismos considerados como normales en un exudado faríngeo son el *Estreptococo pneumoniae* (cuando no está en predominio), estafilococos (coagulasa negativa), estreptococos alfa hemolíticos (*S. viridans*). Algunos individuos se convierten en portadores de bacterias patógenas tales como estafilococos y estreptococos hemolíticos a veces durante años.

Toma de Muestra:

Faríngeo: Se inclina la cabeza del paciente hacia atrás y se ilumina bien la garganta. Se empuja la lengua hacia abajo, utilizando un depresor, de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta. Se frota el hisopo 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.



Nasales: 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 faríngea. 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.

Cultivo: Tanto para el exudado nasal como para el faríngeo debe utilizarse como medio de cultivo agar sangre, siendo esta de carnero, ya que la misma no permite el crecimiento de *Haemophilus haemoliticus* que tiende a confundirse con el estreptococo beta 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 nícrón 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.

Las placas se incuban durante 24 horas a 37°C, 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.

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

- *Streptococcus beta hemolíticos*
- *Streptococcus pneumoniae* (en proporción).
- *Enterococcus spp.*
- *Haemophilus 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.

Streptococos:

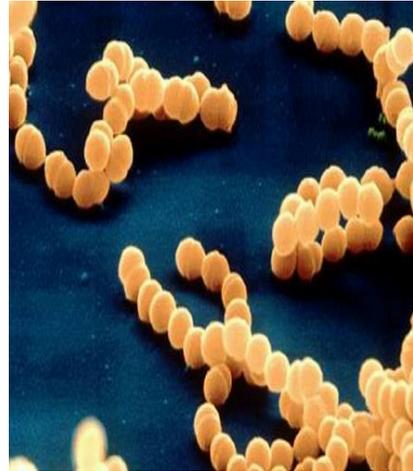


Foto 1: Tomado de Microsoft Encarta 2002.

Los estreptococos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Unos forman parte de la microbiota normal humana mientras que otros son los causantes de diferentes enfermedades. Aproximadamente el 35% de todas las infecciones de las vías respiratorias superiores son causadas por estreptococos beta hemolíticos.

Características de las colonias: La mayor parte de las especies crecen en medios sólidos formando colonias discoidales, grises, opalescentes, delicadas, de bordes lisos y arrugados, y miden entre 0.5

y 2 mm o más de diámetro. Las colonias se hacen visible en placas de agar sangre generalmente en 18 a 24 horas. Las colonias de los estreptococos del grupo A tienen tres aspectos principales: mucoso, mate y brillante. La presencia significativa de colonias con características de estreptococos en un cultivo obliga al técnico a realizar algunas determinaciones preliminares.

Coloración de Gram: Cocos Gram positivos en cadenas, células ovales, esféricas, alargadas, a veces en parejas o cadenas cortas.

Subcultivos: Agar sangre al 5% (sangre de carnero). Las placas por estrías deben incubarse de preferencia en una atmósfera anaeróbica.

Catalasa: Negativa. (Ver capítulo 19)

Indofenol oxidasa. (según Kovack)- Negativa. (Ver capítulo 19)

En la clasificación de estreptococos patógenos se debe emplear una combinación de características hemolíticas, fisiológicas y antigénicas.

Determinación de la hemólisis: El paso más importante para

identificar los estreptococos es determinar la actividad hemolítica del cultivo. La base para el medio de agar debe ser suficientemente rica para permitir el crecimiento de estreptococos y estar libres de azúcares reductores que inhiben la actividad hemolítica, además, la presencia de citrato, como anticoagulante puede inhibir el crecimiento y la actividad hemolítica. Los estreptococos beta hemolíticos productores de peróxido pueden aparecer alfa hemolíticos en la superficie de placas de agar sangre incubadas aerobíamente o en atmósferas de CO₂.

Dos hemolisinas diferentes son responsables de la actividad beta hemolítica. Se diferencian por su antigenicidad y susceptibilidad a la inactivación por oxidación. La estreptolisina "O" es antigénica y oxígeno lábil y la estreptolisina "S" es no antigénica y oxígeno estable. Observando al estereoscopio las colonias y la hemólisis en la estría se puede determinar el tipo de hemólisis que estamos observando.

Hemólisis alfa (α).- Una zona indistinta de destrucción parcial de glóbulos rojos alrededor de la colonia acompañada a menudo de una decoloración verdosa o pardusca del medio.

Hemólisis beta (β).- Una zona clara incolora alrededor de las colonias de estreptococos en la que los eritrocitos han sufrido decoloración total.

Hemólisis alfa prima (α').- Un pequeño halo o envoltura de eritrocitos intactos o parcialmente lisados adyacentes a la colonia bacteriana con una zona de hemólisis total que se extiende más dentro del medio. Al examen macroscópico de hemólisis alfa prima puede confundirse con la beta hemólisis.

Pruebas Fisiológicas:

Grupo A de Lancefield (*S. pyogenes*)

Sensibilidad a la Bacitracina- Se basa en la gran sensibilidad de los estreptococos del grupo A a este antibiótico (se les realiza a los estreptococos beta hemolíticos, ya que pueden haber alfa hemolíticos sensibles a este antibiótico, ejemplo neumococo).

- ◆ Se emplean discos diferenciales (0.04-0.1 Uds. por disco) y no de sensibilidad (10 unidades).
- ◆ Es exclusiva para cultivos puros.
- ◆ Debe emplearse un inóculo abundante.

- ◆ Cada lote de disco deberá probarse con la cepa control.

- ◆ Un halo de inhibición de cualquier tamaño indica sensibilidad según muchos autores.

- ◆ Úsese una base de agar de infusión con 5 % de sangre.

Grupo A sensible el 99 %, Grupo B sensible el 6 %, Grupo C-G sensible 7.5 %, viridans sensible 7.8 %. Si se efectúa una correcta determinación del tipo de hemólisis, si se emplean discos adecuados, un buen inóculo y una correcta lectura, será posible identificar alrededor del 95 % de cepas del grupo A.

PIR: (Hidrólisis de l-pirrolidonil- β -naftilamida). Se basa en la capacidad de los microorganismos de hidrolizar la l-pirrolidonil- β -naftilamida. Se debe realizar a cultivos puros ya que hay una gran variedad de especies no estreptocócicas que son PIR positivas. El 98% de las cepas de estreptococos pertenecientes al grupo A son positivas a esta prueba.

Grupo B de Lancefield (*S. agalactiae*)

Hidrólisis del hipurato de sodio:

Aunque algunos estreptococos del grupo D pueden dar positiva esta prueba, al igual que algunos alfa-hemolíticos, se considera satisfactoria como diagnóstico presuntivo para el grupo B. Se basa en la facultad de este grupo para producir hidrólisis del hipurato que se desdobra en ácido benzoico más glicina. Si se demuestra la presencia de uno de estos dos productos, bien empleando cloruro férrico para precipitar el ácido benzoico o bien empleando la ninhidrina para detectar glicina, la prueba será positiva.

Detección de la hidrólisis del hipurato de sodio: (Anexo).

Prueba de CAMP:

Esta prueba se basa en que la zona de hemólisis incompleta alrededor de una colonia de estafilococo productor de beta-lisina (estafilococos de doble hemólisis) se intensifica al ponerse dicha zona en contacto con la hemólisis de un estreptococo del grupo B. Esto responde al modo de acción de ambas hemolisinas sobre los eritrocitos del medio.

Se efectúa trazando una sola estría del cultivo de estreptococo en sentido perpendicular a una estría

de una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de beta lisina. Las estrías de ambos organismos no deben estar en contacto, aproximadamente 1cm de espacio entre los organismos. Los mejores resultados se han obtenido utilizando sangre de carnero.

Los estreptococos del grupo B producen una sustancia conocida como el factor CAMP, que realza la beta lisina de los estafilococos y en el punto de contacto de los dos organismos aparece una zona mayor de lisis, comúnmente en la forma de una punta de flecha.



Figura #1: Prueba de Camp.

Los Estreptococos beta hemolíticos positivos en la prueba de bacitracina y positivos en la prueba de CAMP pueden ser del grupo A o del B. El bacteriólogo debe decidir a que organismo se semeja más la cepa desconocida lo cual puede hacerse examinando la actividad hemolítica. Los Estreptococos del grupo B muestran mucha menos hemólisis de superficie y

profundidad en agar-sangre que los Estreptococos del grupo A.

Grupo C y G:

Sensibilidad a los discos con sulfametoxazol-trimetropín. Los discos contienen 1.25 mG de trimetoprima y 23.75 mG de sulfametoxazol (resultan sensibles). Son resistentes a la bacitracina. No hidrolizan el hipurato de sodio.

Prueba de CAMP negativa.

Cepas del grupo C	Pruebas Fisiológicas	
	Trehalosa	Sorbitol
<i>St. equisimilis</i>	+	-
<i>St. zooepidemicus</i>	-	+
<i>St. equis</i>	-	-

Caldo de Trehalosa y Sorbitol: (Ver capítulo 19).

Estreptococos grupo D

Grupo D de Lancefield (*S. bovis*).

Prueba de la bilis esculina (BE): Todos los estreptococos del grupo D ennegrecen la BE contenida en tubos inclinados, habitualmente dentro de un plazo de 48 horas. La mayoría de los estreptococos que no pertenecen al grupo D no ennegrecen el medio.

Medio de bilis esculina: (Ver capítulo 19)

Tolerancia a la sal (caldo 6.5% de NaCl):

Una prueba de bilis esculina positiva y un desarrollo positivo en un caldo de NaCl al 6.5% confirman la presencia de *enterococo*. Cabe señalar que un 80% de los estreptococos del grupo B se desarrollan en este medio.

Para diferenciar los enterococos de los estreptococos del grupo D, se empleará, la prueba de la tolerancia al NaCl al 6.5%. Se pudiera realizar también la prueba de sensibilidad a la penicilina.

Caldo 6.5 % (Ver capítulo 19).

Grupo D	NaCl al 6.5 %	Arginina	Piruvato
<i>St. bovis</i>	-	-	-

Medio de descarboxilasa de Moeller para la hidrólisis arginínica (Ver capítulo 19)).

Piruvato: (Ver capítulo 19).

Tabla #3: Características distintivas de los estreptococos

Categoría.	Forma de agrupación.	Hemólisis	Antígeno de grupo Estreptocócico.	Hidrólisis de la bilis esculina.	Crecimiento en NaCl al 6.5%.	Solubilidad en bilis.
<i>Streptococcus beta hemolíticos agrupables</i>	Cadenas	Beta	A,B,C,F,G	-	-	-
Estreptococos grupo D	Cadenas cortas o diplococos	Alfa o ninguna	D	+	-	-
<i>St. viridans</i>	Cadenas	Alfa o ninguna	Ninguno	-	-	-
<i>St. pneumoniae</i>	Diplococos, cadenas cortas	Alfa	Ninguno	-	-	+

+ positivo
- negativo

Tomado de: Facklam,R: Manual de Procedimientos para el aislamiento e identificación de estreptococos. Publicación Científica No. 399. OPS. Washington, DC, 1980.

Pruebas serológicas (antigénicas)

El mejor método para identificar los estreptococos consiste en cultivar colonias puras y aisladas del organismo infectante, extraer el carbohidrato del grupo y demostrar una reacción serológica entre el antígeno extraído y el antisuero específico del grupo.

La técnica de autoclave de Rantz y Randall es relativamente simple de realizar y aunque se extrae menos antígenos de grupo, en comparación con otras, puede utilizarse muy eficazmente para identificar los estreptococos mediante procedimientos serológicos.

Método de extracción por autoclave:

- Las células para la extracción se cultivan en 10 mililitros de caldo Todd Hewitt u otro caldo de cultivo apropiado. Se inocula el caldo, se incuba toda la noche (16 a 24 horas) a 35-37°C.
- Sedimentarse las células por centrifugación.
- Elimínese el líquido sobrenadante y consérvense las células.

- Añadir 0.5 mL de solución de NaCl al 0.9%. Agítese para suspender las células.
- Coloque el tubo y las células en la autoclave durante 15 minutos a 121 grados centígrados.
- Centrifugar para sedimentar los residuos celulares.
- Decantar el líquido sobrenadante en un recipiente limpio, elimínese el sedimento.
- Póngase en contacto con los antisueros de grupo.

Prueba serológica: (método Ouchterlony)

Se confeccionan láminas de agarosa a las cuales se les hacen hoyuelos, el diámetro de los posillos debe de ser de 3mm y la distancia entre el pocillo central y los pocillos periféricos es de 7.5 mm. Se añade el antisuero del estreptococo de un grupo conocido en el hoyuelo central, y en los hoyuelos que lo rodean ponemos las sustancias antigénicas de los estreptococos de los cuales queremos conocer el grupo, aunque siempre ponemos uno conocido que nos sirva de control positivo. Se ponen las placas en cámara húmeda entre 4-8°C y se leen a las 24, 48, y 72 horas. Las positivas formarán una línea de precipitación blanquecina.

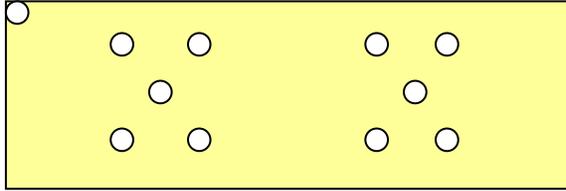


Figura #2: Lámina de agarosa perforada.

Placas en agarosa: (Ver capítulo 19)

Grupo A *St. pyogenes*

Grupo B *St. agalactiae*

Grupo C *St. equisimili*

St. equi,

St. zooepidemicus

Grupo D : *St. bovis*

Estreptococo pneumoniae:

Esta especie se estudia aparte, ya que no posee el antígeno de grupo-específico (carbohidrato C) al igual que otros alfa hemolíticos, integrantes del grupo viridans. Las pruebas presuntivas más comúnmente empleadas para el diagnóstico de los mismos son el de la sensibilidad a la optoquina y la de la solubilidad en bilis.

Subcultivos: Agar sangre al 5% se incuba en CO₂ entre 5 y 10%

Prueba de la optoquina - Tres o cuatro colonias sospechosas se siembran por estría en un cuarto de la placa y el disco de optoquina se coloca en el tercio superior de la zona estriada, la placa se incuba en incubadora de CO₂. Se han establecido requisitos en cuanto al diámetro de las zonas de inhibición, pero debe aceptarse una amplia variación en la zona crítica, por ejemplo si se usa un disco de 6 mm, la zona de inhibición debe tener un diámetro de por lo menos 14 mm para que la prueba pueda considerarse positiva respecto a neumococos. Si el diámetro del halo de inhibición fuera menor de 14 mm entonces se considera dudoso este resultado y tendríamos que hacer la prueba de la solubilidad en bilis para diagnosticar el neumococo.



Figura 2: Prueba de la Optoquina

Tabla #4: Resultados de la prueba de Optoquina.

Tamaño del disco	Zona de inhibición	Resultados
6 mM	14 o más	Positiva
6 mM	6 a 14 mM	Dudosa
10 mM	16 o más	Positiva
10 mM	10 a 16 mM	Dudosa

Tomado de: Facklam, R: Manual de Procedimientos para el aislamiento e identificación de estreptococos. Publicación Científica No. 399. OPS. Washington, DC, 1980.

Pruebas de Solubilidad en Bilis- (desoxicolato de sodio al 10) (Ver capítulo 19)

Caldo triptona-fosfato: (Ver capítulo 19).

Todos los Streptococcus pneumoniae son solubles en bilis aunque algunos se solubilizan solo parcialmente. En el caso de las cepas parcialmente solubles pero que son sensibles a la optoquina deben identificarse como Streptococcus pneumoniae, en el caso de las cepas que son parcialmente solubles y resistentes a la optoquina no son Streptococcus pneumoniae y deben identificarse como estreptococos alfa.

Haemophilus:

La especie tipo, *Haemophilus influenzae*, causa diversas enfermedades humanas, que van desde las respiratorias crónicas hasta infecciones invasivas. Las cepas aisladas de infecciones invasivas están generalmente capsuladas. Los microorganismos *H. influenzae* no capsulados y *H. haemolyticus* pertenecen a la Microbiota Normal del tracto respiratorio superior, excluyendo la cavidad bucal. La mayoría de las cepas comensales de *H. influenzae* pertenecen a los biotipos II y III.

Características de las colonias:

En agar infusión de cerebro-corazón con sangre, se desarrollan en 24 horas colonias redondas, convexas, pequeñas, con intensa iridiscencia y aspecto de rocío. En agar chocolate tardan de 36 a 48 horas en alcanzar diámetros de 1 mm.

Coloración de Gram: Son Gram negativos, la morfología de los microorganismos *Haemophilus* va de los cocobacilos a los bacilos filamentosos no acidófilos,

Subcultivos: Agar sangre con estría de estafilococo, agar chocolate o agar Levinthal. Casi todas las cepas crecen mejor en atmósfera húmeda con 5 a 10 % de CO₂ añadido. La

temperatura óptima es de 33 a 37°C. Se ha comprobado que el agar chocolate con suplemento de bacitracina (300 mg/l) brinda recuperaciones excelentes

La identificación de las distintas especies del género se basa en la dependencia de uno o ambos factores, la producción de hemólisis, la necesidad de CO₂ para su crecimiento y en una serie de pruebas bioquímicas como la fermentación de diversos azúcares y la producción de ureasa y oxidasa.

Su crecimiento in vitro requiere factores de crecimiento accesorios: factor X (hemina) y factor V (nicotinamida-adenina-dinucleotido)

Prueba para determinar la dependencia al factor X y/o V:

- Se realiza el aislamiento de la cepa en cuestión con el objetivo de obtener un cultivo puro.
- De este cultivo puro tomamos una asada con abundante inóculo y lo añadimos a un tubo que contiene 2-3 mL de agua peptonada o buffer fosfato.
- Tomamos una placa de agar nutriente y la inoculamos con una asada del agua peptonada que contiene la cepa que queremos probar.
- Dejamos que se seque la superficie de la placa.

- Colocamos los discos impregnados en los factores (V, X) a 1-2 cm de separación.
- Se incuba a 37°C durante 24 horas.
- Se realiza la lectura.

De esta forma podemos determinar de que factor o factores depende esta cepa para su crecimiento.

Prueba de la Porfirina:

La prueba de la porfirina es un medio más exacto y rápido para determinar el requerimiento de factor X. Este método se basa en la observación de que las cepas de *Haemophilus* independientes de la hemina secretan porfobilinógeno y porfirinas, ambos intermediarios en la vía biosintética de la hemina, cuando se les suministra el ácido delta aminolevulínico. Las cepas que requieren factor X no excretan estos compuestos debido a la falta de todas las enzimas que participan en la biosíntesis de hemina.

Sustrato.- El sustrato consiste en clorhidrato 2 mM de ácido δ -aminolevulínico (Sigma Chemical Co. y St. Louis, Mo) y $MgSO_4$ 0.8 mM en buffer fosfato 0.1 M a pH 6.9. El sustrato se distribuye en cantidades de 0.5 mL en pequeños tubos de vidrio y puede guardarse varios meses en un refrigerador.

Inoculación: Suspender en el sustrato un asa llena de bacterias de un cultivo de placa de agar. Incubar durante 4 horas.

Lectura: Después de la incubación exponer a una luz de Wood (longitud de onda aproximada, 360 nM), preferiblemente en cámara oscura. La fluorescencia roja de las células bacterianas y/o del líquido indica porfirina, es decir que la cepa es independiente del factor X. En casos de reacciones dudosas, los tubos pueden reincubarse hasta 24 horas.

Método alternativo de lectura: Después de incubación, añadir 0.5 mL de reactivo de Kovacs, agitar vigorosamente y dejar separar las fases. El color rojo en la fase acuosa inferior indica porfobilinógeno, lo que significa que la cepa es independiente del factor X. Cuando este método se emplea para la lectura, es aconsejable incluir un tubo inoculado sin ácido delta-aminolevulínico como control negativo. El reactivo de Kovacs da una reacción de indol en la fase alcohólica superior, las cepas indol-positivas de *H. influenzae* pueden identificarse por error como independientes del factor X en ausencia de un control apropiado. La producción de hemólisis nos permite distinguir, a su vez, a *H. haemolyticus* y *H.*

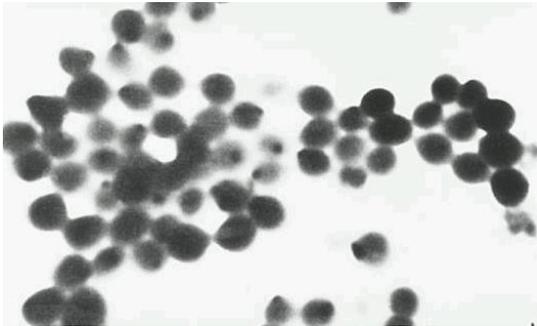
parahaemolyticus de *H. influenzae*
y *H. parainfluenzae*.

Basándose en las diferencias antigénicas de su polisacárido capsular, las cepas de *H. influenzae* pueden clasificarse en seis serotipos (a-f).

Atendiendo a una serie de pruebas bioquímicas (producción de indol, de ureasa y de ornitina-descarboxilasa) se distinguen varios biotipos de *H. influenzae* (I-VIII), lo cual puede tener un interés epidemiológico.

Estafilococo:

Figura 3



Tomado de: Microsoft Encarta 2002.

Los estafilococos en particular *S. epidermidis*, son miembros de la microbiota normal de la piel, las vías respiratorias y gastrointestinales del hombre. Del 40 al 50% de los seres humanos son portadores nasales del *S. aureus*. Los estafilococos patógenos hemolisan a menudo la sangre, coagulan el plasma y producen diferentes enzimas y toxinas extracelulares. Un tipo común de envenenamiento alimenticio es producido por una enterotoxina estafilocócica termoestable.

Características de las colonias:

Las colonias desarrolladas en medios sólidos (agar-sangre de carnero), en un período de 18 a 24 horas tienen un diámetro de 1 a 3 mm y de 3 a 10 mm en incubación prolongada durante 5 días, las mismas son redondas, lisas,

elevadas y resplandecientes. *Staphylococcus aureus* suele formar colonias de color gris a amarillo dorado intenso. Las colonias de *S. epidermidis* casi siempre son de color gris a blanco en el aislamiento primario.

Coloración de Gram: Son cocos Gram positivos, se agrupan en racimos irregulares en forma de uvas, tétradas, cadenas cortas (3 o 4 células) y pares, o como células individuales.

Subcultivos: Agar sangre al 5 %, aerobios y/o facultativos. Temperatura de 37 °C

Catalasa: Positiva (Ver capítulo 19).

Motilidad: Negativa

La capacidad de coagular el plasma es el criterio más usado y aceptado para la identificación de estafilococos patógenos. Pueden hacerse dos pruebas, en tubo de ensayo para coagulasa libre y en portaobjeto para coagulasa unida o factor de agregación. La prueba en tubo es la más decisiva.

Coagulasa: (plasma en caldo corazón proporción 1: 10)

- Añadimos 0.5 mL de plasma reconstituido en un tubo de ensayo.

- Inoculamos este medio con una colonia grande bien aislada en agar no inhibitorio.
- Se incuba a 37°C.
- A las cuatro horas observamos para ver si se ha formado coagulo, sino se deja incubando durante toda la noche.
- Cualquier grado de coagulación constituye una prueba positiva. Sin embargo, un precipitado floculento o fibroso no es un coagulo verdadero y debe registrarse como negativo.

Prueba de la producción de mucus: (test de sline)-

Determinación de la virulencia en los estafilococos al igual que la DNAsa. Se les debe hacer a todos

los Estafilococos coagulasa negativa, excepto los que provengan de sitios que se consideren flora normal.

- Tomar un cultivo puro crecido en caldo por 48 horas a 37°C.
- Verter el caldo de cultivo, dejando escurrir bien el tubo
- Añadir a cada tubo una gota de solución de safranina al 20%
- Esparcir el colorante en toda la parte interna del tubo que estuvo ocupada previamente por el cultivo en caldo.

Lectura:

Se hace a trasluz, mirando si las paredes y el fondo del tubo retiene en toda su superficie el colorante (prueba positiva).

Si retiene el colorante solo en la interfase entre el aire y el líquido, quedando las paredes limpias, la prueba es negativa.

Interpretación:

Estafilococo coagulasa negativa mucus positiva, posible infeccion, pues son capaces de producir una sustancia mucoide adherente sobre superficies inanimadas como es plásticos y el cristal.

Informe:

Estafilococo coagulasa negativo posible infeccion.

Estafilococo coagulasa negativa no infeccion.

Enterococos:

Los enterococos constituyen un numeroso grupo bacteriano de la flora intestinal del humano y de los animales, incluidos en el nuevo género *Enterococcus* desde 1984. Es uno de los más importantes patógenos nosocomiales, responsable de bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas e

infecciones del tracto urinario. De las especies bacterianas pertenecientes al género *Enterococcus*, *E. faecalis* constituye la especie tipo y junto al *E. faecium* son los más comúnmente aislados del ser humano, aconteciendo para un 85-95 % y 5-10 % de las afecciones respectivamente.

Pruebas para *Enterococcus*.

Tabla #5: *Enterococos*. Pruebas.

Enterococcus	NaCl al 6.5 %	Arginina	Piruvato
<i>E. faecalis</i>	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	-

Tomado de:

Coloración de Gram: Son cocos Gram positivos en parejas o dispuestos en cadenas cortas.

Características de las colonias: Sus colonias resultan mayores que las de los estreptococos del grupo A, menos opacas y a veces blanca-brillantes semejantes a colonias de estafilococos.

Subcultivos: Se cultivan en agar sangre al 5 %. Pueden presentar α , γ , y raramente β -hemólisis, en específico *E. faecalis* var *zimógenes*.

Prueba de la bilis esculina: Resultan positivos en la prueba de

hidrólisis de la bilis-esculina. (Ver capítulo 19).

Tolerancia a la sal (caldo 6.5% de NaCl): Crecen en presencia de cloruro de sodio al 6,5 %. (Ver capítulo 19)

Branhamella catarrhalis:

Puede estar implicada en la etiología infecciosa de las enfermedades respiratorias bacterianas más frecuentes en nuestro medio. Es considerada una bacteria patógena desde 1990 y se han reportado en los últimos años aislamientos de enfermos con infecciones respiratorias en Europa, Japón y Estados Unidos.

Características de las colonias:

Colonias convexas, no pigmentadas o grisáceas, no hemolíticas, opacas, lisas, que no se adhieren al medio.

Coloración de Gram: Diplococos arriñonados Gram. negativos.

Subcultivos: Agar sangre al 5%.

Oxidasa : Positiva. (Ver capítulo 19)

DNAsa: Positiva.

Reducción de nitrato a nitrito:

Positivas.

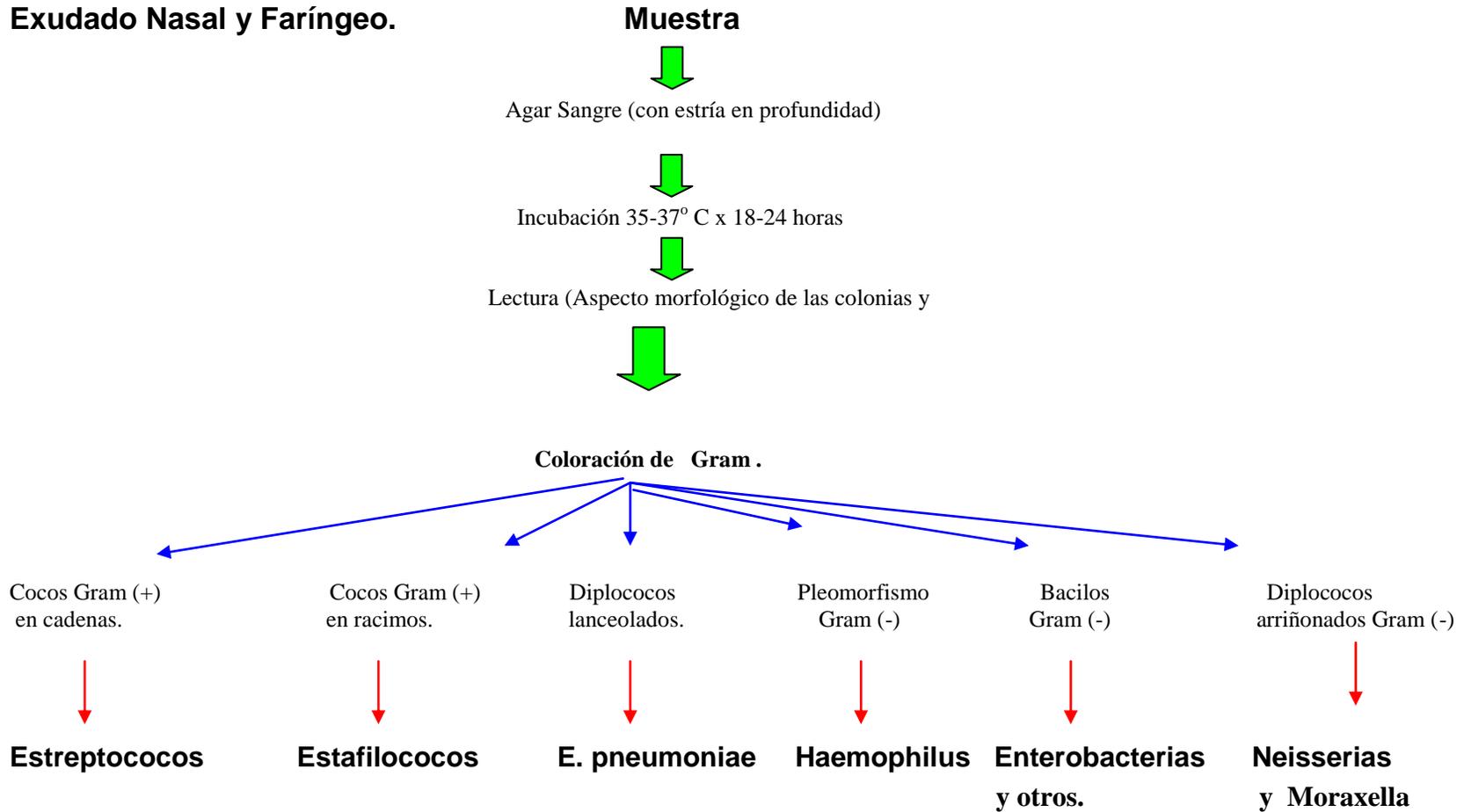
Producción de ácido de:

Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Fructosa
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Enterobacterias: Ver capítulo 13;
Coprocultivo.

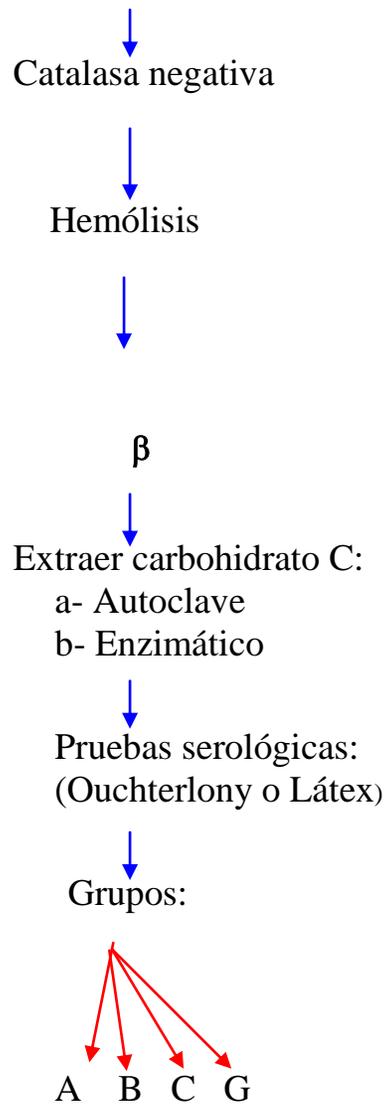
Algoritmo #7:

Exudado Nasal y Faríngeo.



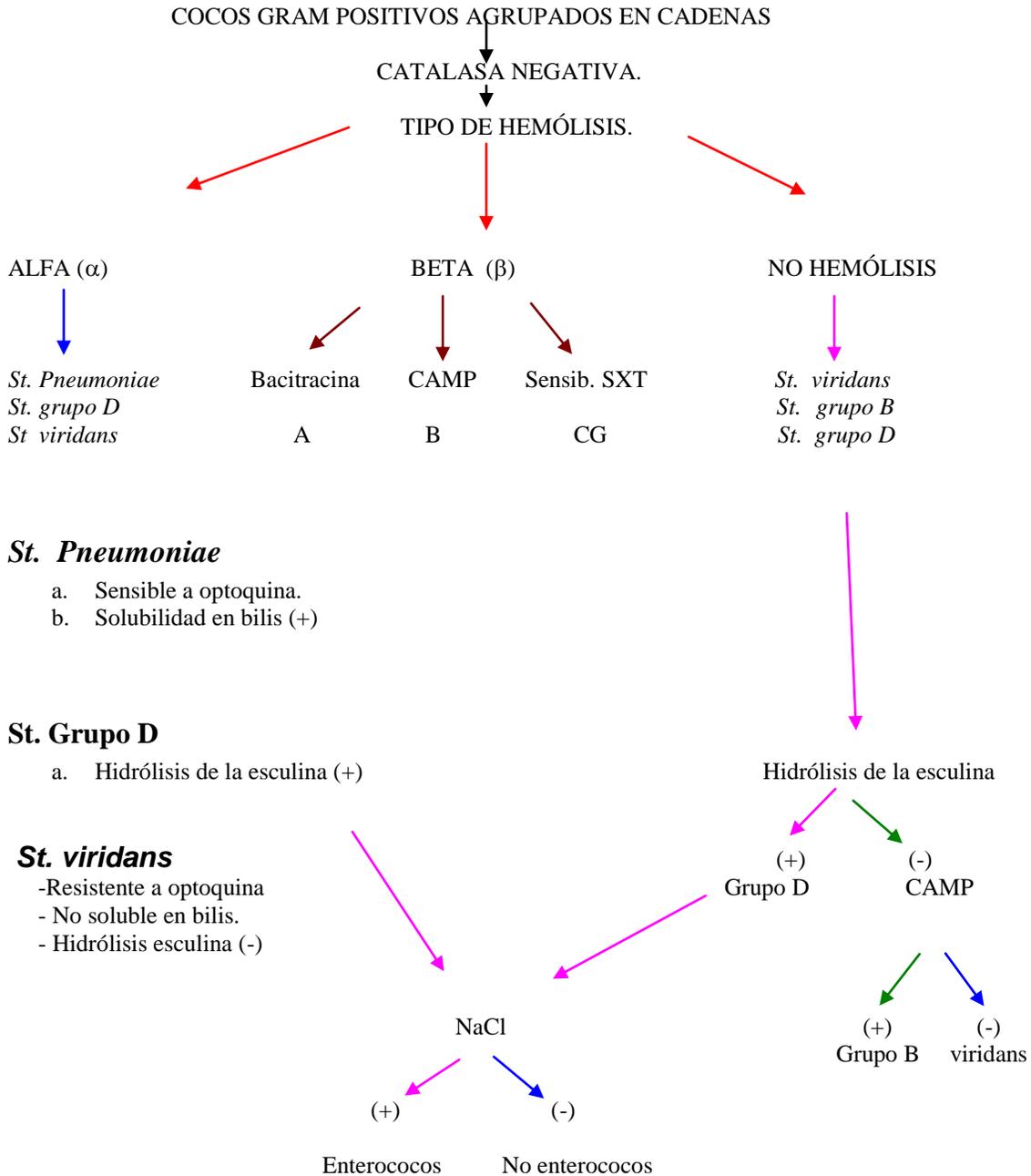
Algoritmo #8 *ESTREPTOCOCOS:*

Cocos Gram positivos en cadenas

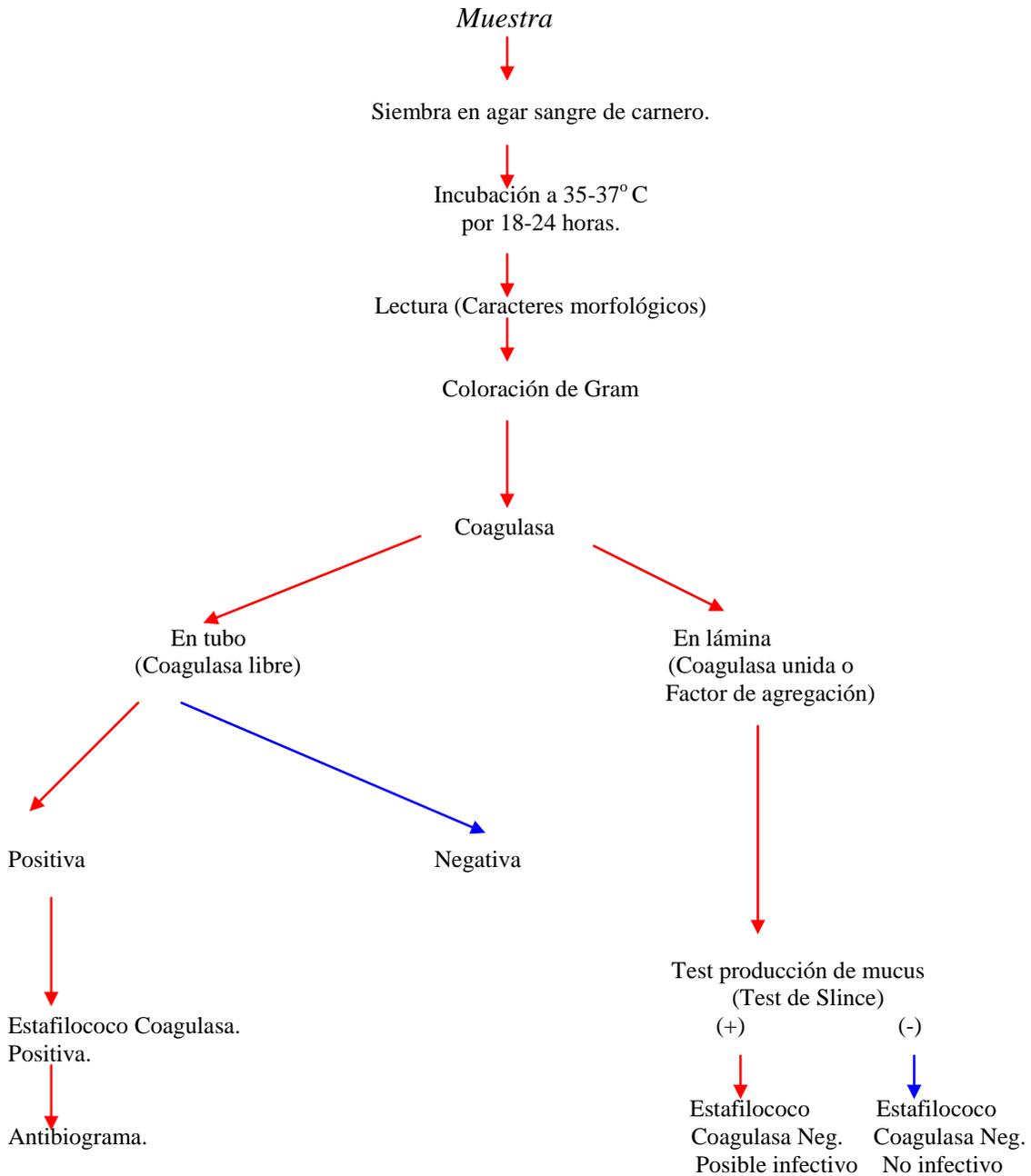


Algoritmo #9

MARCHA TÉCNICA ESTREPTOCOCOS: PRUEBAS PRESUNTIVAS.



Algoritmo #10 ESTAFILOCOCOS: MARCHA TÉCNICA



E. pneumoniae: Ver marchas de L.C.R.

H. influenzae: “ “ “

Enterobacterias: ver marchas de Coprocultivo.

Neisserias: Ver marchas de L.C. R. y Genitales.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Ariza C.X., Carratala F.J y Gudiol MF: Infecciones por cocos grampositivos. Infecciones estreptocócicas, neumocócicas y estafilocócicas, en Tratado de Medicina Interna tomo I. Masson. 1997:
2. Ayoub, E.M; Onel B. Dudding. Streptococcal group A Carbohydrate antibody in rheumatic and nonrheumatic bacterial endocarditis. J. Lab. Clin. Med.; 76:322-332. 1970
3. Barret, D.J.M. Triggiani, and E.M. Ayoub. Assay of antibody to group A Streptococcal carbohydrate by enzyme-linked. Immunosorbent assay. J.Clin.Microbiol.; 18:622-627. 1983.
4. Bass J.W, Weise ME, Plymyer MR, et al. Decline of erythromycin resistance of group A beta-haemolytic streptococci in Japan. Arch Pediatr Adolesc med.; 148:67-71. 1994.
5. Bernheimer,A., Linder, R, and Avigad, L.S. Infect Immunol.; 23: 838. 1979.
6. Bisno A.L. Streptococcus pyogenes in: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds. Principles and practice on infections Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone,inc;:1786-1799. 1995.
7. Borbeau P, Campos JM. Current antibiotic susceptibility of group A beta-haemolytic streptococci. J Infect Dis.; 145:916. 1982.
8. Bowers, E.F, and Jeffrier, L.R.J. Clin. Pathol.; 8:58. 1955.
9. Brawford, W.L.: Infecciones bacterianas en: Tratado de Pediatría Nelson, W.E. y col. Tomo I, 6ta. Ed, en español, Editorial Salvat S.A., Barcelona, España.:557-564. 1976.
10. Bradley, J. S, Schlievert, P.M, Peterson, B.M. Toxi shock-like Syndrome, a complication of strep throat. Pediatr Infect Dis J.; 10:790. 1991.
11. Breese, B.B. A Single Scorecard for the Tentative Diagnosis Streptococcal Pharyngitis. Americ. Journal Dis. Child.; 131:514-517 . 1977.
12. Breese BB, Breese Hall C. Beta haemolytic Streptococcal Disease. Boston, MA: Houghton Mifflin Profesional Publishers.:78-96. 1978.

13. Brown J.H, Monogr. Rockefeller Inst Med.Res.No.9; 1919. quimioprofilaxis. Pediatrics (Ed esp). 1992; 34:283-287.
14. Callis, H.A.: Streptococcus. en: Zinsser Microbiology. 16 ed. Edit. Joklik W.K. Willet H.P. Acc, New York. EUA.:430-444. 1976. 20. Cruz M. Tratado de Pediatría. 7a ed. Barcelona. España. 1994: 1666.
15. Chang M.J. Mohla C. Ten minute detection of group A streptococci in paediatric throat swabs. J.Clin.Microbiol.; 21:258-259. 1985. 21. Cusa Arribas, Celia y Zuazo Silva, J.L.: Los estreptococos como agentes etiológicos de patologías ginecobstetricia y neonatal. Trabajo de terminación de la residencia para optar por el título de especialista de 1er. Grado en Microbiología. Habana. Cuba. 1980
16. Chapnick EK, Gradon JD, Lutwick LI, et al. Streptococcal toxic shock Syndrome due to noninvasive pharyngitis. Clin Infect Dis. 1992; 14:1074-1077. 22. Dajani A.S, Bisno A.I, Chung K.J, et al: Prevention of rheumatic fever: A statement for health professionals by the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the American Heart Association. Pediatr Infect Dis J. 1989; 8:263-266
17. Christie, R, Atkins, N.E. and Munch-Petersen, E. Aust.J.Exp. Biol. Med.Sci. 1944; 22:197. 23. Dale. J.B, y Beachey, E.H. Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with Sarcolenal protein of human. Heart J. Exp. Med. 1982; 156:1165-1176
18. Collada Peña I.: Estudio de título antiestrepolisina "O" (AELO) en un grupo de adultos sanos donantes de sangre del municipio Bayamo. Trabajo para optar por el título de especialista en Microbiología. Gramma. 1984 24. Dippel DW, Touw-otten F, Habbema JDF. Management of children with acute pharyngitis: A decision analysis. J Fam Pract. 1992; 34:149-159
19. Committee on Infections Diseases and Committee of Fetus and Newborn. Pautas para la prevención de la infección por estreptococos del grupo B (EGB) mediante

25. Dissciasio, G., y Taranta, A.: Rheumatic fever in children. *Ann Heart J.* 1980; 99:635-658
26. Dudding, B.A. and E.M. Ayoub. Persistence of streptococcal antibody in patients with rheumatic valvular disease. *J. Exp. Med.* 1968; 128:1081-1098
27. Dulbeco Davis, B.D. y cols.: *Tratado de Microbiología.* Salvat editores, S.A. Barcelona. 1975:478
28. Edwards L. Kaplan, MD. The rapid identification of group A beta-hemolytic streptococci in the upper Respiratory Tract. *Pediatrics Clinics of North America.* 1988; 35:3
29. Facklan, R.R. Isolation and identification of streptococci, parts I-III, Atlanta, Center for disease control. 1977
30. Finland M, Garner C, Wilcox C, et al. Susceptibility of beta-hemolytic streptococci to 65 antibacterial agents. *Antimicrob agents chemother.* 1976; 9:9-11
31. Forsyth RA. Selective utilization of clinical diagnosis in treatment of pharyngitis. *J Fam Pract.* 1975; 2:173-177
32. Fuji R. Consumption of antibody in Japan. *Chemotherapy.* 1977; 25:418-423
33. Galvez, B.E. Fiebre Reumática, en *Tratado de Medicina Interna* tomo I, Masson, Barcelona. España. 1997:149
34. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Batilmore RS. A ten year review of neonatal sepsis and comparison with previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J.* 1990; 9:919-825
35. Glezen WP, Clyde WA, JR, Senior RJ, Sheaffer CI, Denny FW. Group A Streptococci, Mycoplasma, and Viruses associated with acute pharyngitis. *JAMA.* 1967; 202:455-460
36. Goldstein, J. and R. Caravano. Determination of antigroup streptococcal polysaccharide antibodies in human sera by an hemagglutination technique. *Proc. Soc. EXP. Biol. Med.* 1967; 124:1209-1212
37. Golstein I, Rebeyrota, P; Parlebar, J. y Halpera, B.: Isolation from heart valves of glycopeptides with share immunological properties with *Streptococcus haemolyticus* group "A". *Polysaccharides Nature.* 1968; 219:866-868

- 38.Griffith, F.J HGG.1935; 35:23
- 39.Gubash. S.M.J. Clin. Microbiol. 1978; 8:480
- 40.Halpen, B. and I. Goldstein. Utilization du Polyside streotococci marque on C14 pour la determinacion de faibles quantities d' anticorps specifiques des serums experimentaux et humans. Rev Immunol. 1964; 28:193-240
- 41.Hammerling, V. and O. Westphal. Synthesis and of use of O stearyl Polysacaride in passive hemagglutination and hemolysis. Eur. J. Biochen. 1967; 1:46-50
- 42.Herold, AH. Group A beta-hemolytic streptococcal toxic shock from a mild pharyngitis. J.FAM Pract. 1990; 31:549-551
- 43.Honikman, C.H, Massell BF, Goodell RA, et al. Treatment of group A Streptococcal infections; comparison of Sulfamethoxazole and buffered Penicillin G. Am J Dis Child. 1969; 117:451-457
- 44.Honikman, CH, Massell BF. Guidelines for the selective use of throat cultures in the diagnosis of streptococcal respiratory infection. Pediatrics. 1971; 48:573-582
- 45.Huovinen, P, Lahtonen R, Ziegler T, et al. Pharyngitis in adults: The presence and coexistence of viruses and bacterial organisms. Ann Intern Med. 1989; 110:612-616
- 46.Hwang, M. and Ederer, G. J Clin Microbiol. 1975; 1:114-115
- 47.Índice Cruzado: Relación alfabética de medicamentos de producción nacional e importación. MINSAP, Viceministerio Industria médico-farmacéutica, Cuba; Enero.1984
- 48.Brooks GF, Batel JS, Ornston LN, Jawetz, E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editora: El Manual Moderno, S.A., México.11, DF.1981:595
- 49.Brooks GF, Batel JS, Ornston LN, Jawetz, E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V. Mèxico.D.F.1992
- 50.Joklik.W.K., Willete, D.Bernald Ana. Zinsser Microbiologia.

- Ciudad de la Habana. Edit Científico Técnica. 1983:529
51. Kaplan EL, Top FH, Jr., Dudding BA, Wannamaker LW. Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. *J Infect Dis.* 1971; 123:490-501
52. Karma P, Pukander J, Pentilla M. Azitromycin concentrations in sinus fluid and mucosa after oral administration. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991; 10:856-859
53. Klein, G.C. Effect of type of the red blood cells on antistreptolysin "O" titers. *Appl. Microb.* 1968; 16(11):1761-63
54. Klein J.O. Reemergence of virulent group A Streptococcal infections. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10:S3-S6
55. Klein JO. Management of streptococcal pharyngitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1994; 13:572-575
56. Lancefield R.C. Serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933; 57:571
57. Lennette EH, Balows A.; Hansler W. y Triant J. Manual de microbiología clínica 3ra, Edición Revolucionaria. 1982:126-158
58. Litvak. J. y cols. Programa de cooperación inter países de la OPS sobre prevención de la Fiebre Reumática. *Bol de la OPS. VOL. LXXXVIII, No2,* feb.1980
59. Lowbury E.J.L., Cason J.S. Aureomycin and erythromycin therapy for *Streptococcus pyogenes* in burns. *Med J.* 1954; 2:914-915
60. WHO: Acute Respiratory Infections Laboratory Manual of Bacteriological Procedures. Western Pacific Education in Action Serie No.1. Manila. Philippines. 1986.