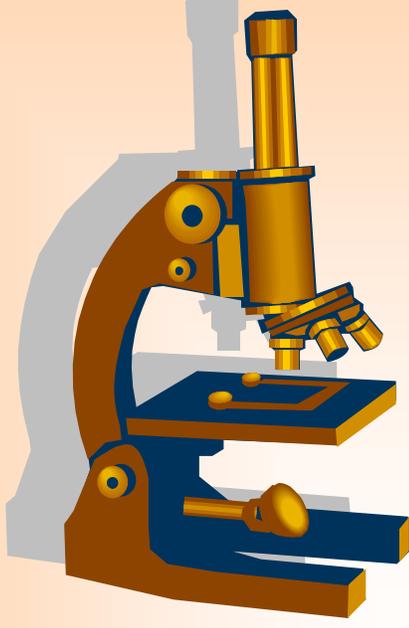


EXUDADOS PURULENTOS.



Procedimientos Técnicos en Microbiología Clínica.

PROCESAMIENTO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LAS MUESTRAS DE PIEL, LÍQUIDOS CORPORALES Y OTRAS LESIONES PURULENTAS.

Dr. Carlos M. Rodríguez Pérez.

Dra. Giselle Álvarez Pavón.

Dra. Carmen Rodríguez Acosta.

Introducción:

La piel (del latín *pellis*) debe considerarse como un órgano en forma extendida, a modo de membrana de revestimiento que contiene y protege del ambiente a todos los demás órganos y aparatos del cuerpo humano. Constituye el órgano mayor de la economía al representar hasta un 10% del peso total del individuo; es un órgano dinámico que contiene muchos tejidos, tipos de células y estructuras especializadas que en conjunto desempeñan múltiples funciones decisivas para la salud y la subsistencia.

Esta estructura constituye en primer lugar una barrera física contra los microorganismos, evitando la entrada de agentes infecciosos a zonas más internas del organismo. Esta función protectora es, por una parte de tipo mecánico debido especialmente al estrato córneo que constituye la capa más externa de la epidermis y que está formado por restos celulares fundidos y aplanados, compuestos

fundamentalmente por queratina, una proteína fibrosa; además la piel posee su propia microbiota, que varía a lo largo de las distintas zonas por donde se extiende, pero que en general predominan las bacterias Gram positivas con varias especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus*, *difteroides* y *anaerobios*. En las zonas más húmedas de la piel la cantidad y variedad de los microorganismos comensales es mayor. En conclusión, podemos decir que la propia microbiota normal, el pH, la temperatura, el sudor y otras sustancias excretadas por la piel, desempeñan un importante papel como factores que limitan la colonización por microorganismos potencialmente patógenos.

Por ello, la entrada de microorganismos patógenos a través de la piel tiene que ir precedida *necesariamente* de una modificación de esta barrera protectora mediante mecanismos físico-químicos. Por

ejemplo, el excesivo contacto con el agua implica un cambio del pH y puede permitir la entrada de *Leptospira interrogans* presente en el agua contaminada; la producción de pequeñas heridas de afeitado vehiculiza estafilococos colonizantes de la piel produciendo forunculosis; los catéteres introducidos en la vena de los pacientes son causa de bacteriemias; el pinchazo mediante agujas de tatuaje contaminadas introduce el virus de la hepatitis B; la picadura de artrópodos introduce el *Plasmodium*, agente causal del paludismo; o la mordedura de un animal infectado introduce el virus rábico.

Las excepciones a esta regla general las constituyen determinados microorganismos pluricelulares como los helmintos que disponen, en alguna fase de su complicado ciclo biológico, de mecanismos para atravesar la piel; es el caso de las especies de *Schistosoma*.

Infecciones cutáneas de origen bacteriano.

Son infecciones que se desarrollan sobre la piel intacta, previamente sana, causadas por patógenos oportunistas de la propia microbiota normal o por microorganismos exógenos con capacidad de producir lesiones a este nivel. Entre ellas tenemos:

Foliculitis o forunculosis: son infecciones generalmente benignas del folículo piloso que se presentan más a menudo en la práctica extrahospitalaria, aunque también pueden encontrarse en pacientes hospitalizados. El *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de ambas entidades.

Impétigo: El impétigo es una infección de la piel causada fundamentalmente por *Streptococcus β hemolítico del grupo A*, pero también por *S. aureus* o por la asociación de ambas bacterias.

Se trata de una infección superficial de la piel que se manifiesta como una lesión eritematosa sobre la que se forman vesículas, las cuales se rompen dejando úlceras superficiales que posteriormente se recubren de una costra amarillenta reseca en la que puede encontrarse el agente etiológico.

Existe una forma bullosa de la enfermedad caracterizada por la formación de grandes bullas y por la descamación papirácea de la piel, generalmente causada por *S. aureus*. A su vez, las lesiones de impétigo pueden confundirse raramente con lesiones herpéticas o de otra naturaleza.

Aunque el agente etiológico puede aislarse de las lesiones, el diagnóstico es fundamentalmente clínico.

Erisipela. La erisipela es una de las formas de celulitis superficial causada por *Streptococcus* β hemolítico del grupo A, que produce enzimas de diseminación (estreptoquinasa, hialuronidasa), que facilitan su extensión a los tejidos, y en algunos de los casos a la sangre.

Se trata de un proceso inflamatorio de la piel que afecta a zonas más profundas, localizadas a nivel de la dermis. Puede acompañarse de fiebre y síntomas generales y remite con descamación posterior de la piel. Hay además aumento del volumen de sedimentación globular (VSG), del título de antiestreptolisinas y leucocitosis.

Los cultivos de la piel, incluso cuando se toman correctamente en el borde entre piel sana y enferma, son poco rentables. Los hemocultivos suelen ser positivos sólo en aproximadamente un 5% de casos.

Otras formas de celulitis estreptocócica: Existen cuadros de celulitis estreptocócica superficial que no cumplen las características de erisipela. La inflamación no está tan claramente delimitada y no existe una clara distinción entre tejido sano y afecto. En general, surge como una complicación en áreas con traumatismos menores, quemaduras o cirugía previa. El paciente puede tener fiebre y presentar linfangitis y bacteriemia.

Fascitis necrosante: La gangrena estreptocócica o fascitis necrosante tipo II (para diferenciarla de la tipo I o gangrena sinérgica con coexistencia de microorganismos anaerobios estrictos) es una infección poco habitual con participación de tejidos subcutáneos y de fascias adyacentes. Es rápidamente invasora y produce necrosis local y síndrome sistémico grave, constituyendo la forma más grave de infección de tejidos blandos por *S. pyogenes*. Puede acompañarse de miositis gangrenosa, shock séptico y fracaso multiorgánico.

Las técnicas disponibles para el diagnóstico rápido de este tipo de infecciones son la tinción de Gram o sus equivalentes para histología, la detección de antígenos del grupo A directamente de muestras de exudado de las lesiones, y el aislamiento en cultivo. Las técnicas de demostración genómica con métodos de biología molecular no están disponibles más que con carácter de investigación.

Miositis, mionecrosis o gangrena estreptocócica. Es un cuadro no siempre fácil de distinguir del anterior, ya que puede constituir una extensión del mismo. Exige la destrucción del tejido muscular (mionecrosis o gangrena) y puede ocurrir en pacientes totalmente sanos y sin puerta de entrada clara. En lo referente al diagnóstico se rige por los mismos principios apuntados para la fascitis necrosante.

Síndrome de la piel escaldada: este cuadro es una dermatitis exfoliativa que afecta generalmente a niños y se caracteriza por la aparición de zonas exantematosas o eritematosas donde la epidermis se separa con facilidad, dando lugar a grandes áreas de descamación.

Se debe a la acción de una exotoxina (exfoliativa) producida por algunas cepas de *S. aureus* y que causa destrucción de las conexiones intercelulares, desprendiendo las capas más superficiales de la epidermis.

Abscesos cutáneos: se presentan como nódulos dolorosos de diferente localización corporal, pudiendo ser abiertos o cerrados. la etiología puede variar según la región donde aparezcan, aunque de manera general puede considerarse *S. aureus* como la causa más frecuente.

Micosis superficiales.

Son infecciones producidas por hongos con baja virulencia, que afectan la queratina de la capa córnea de la piel, los pelos y las uñas. De todas ellas, las dermatomicosis son muy frecuentes y son producidas por hongos llamados *Dermatofitos*, que pueden producir infecciones en las localizaciones mencionadas. Otras micosis frecuentes son la Pitiriasis versicolor producida por *Malassezia furfur* que afecta la piel y las

Candidosis que afecta la piel, las mucosas y las uñas. Otras más raras son Piedra blanca, Piedra negra que son afecciones que se producen en el cuero cabelludo y el pelo respectivamente y la Tiña nigra palmaris que afecta fundamentalmente la piel de la palma de las manos.

Infecciones subcutáneas.

Son infecciones localizadas en zonas más profundas de la dermis, y que afectan el tejido subcutáneo. Pueden presentarse por manifestaciones únicamente de tipo superficial o producir una necrosis de los tejidos subcutáneos que da lugar a cuadros graves de destrucción celular.

Celulitis: es una infección del tejido celular subcutáneo que generalmente se desarrolla sobre una lesión previa de la piel es causada por microorganismos que la infectan desde el exterior, o más raramente tras la llegada de éstos por vía sanguínea.

La mayoría de los casos son producidos por *S. aureus* y *S. pyogenes*, aunque también puede deberse a otros microorganismos, dependiendo de la exposición a determinados factores ambientales o de la naturaleza de la infección primaria sobre la que se origina. La celulitis por anaerobios se produce en lugares con mala irrigación, como son heridas y traumatismos con tejido necrótico, y en personas con

problemas circulatorios. Es típica de pacientes diabéticos, localizada en los pies, y causada por microorganismos anaerobios, a veces junto a aerobios, procedentes de su propia microbiota intestinal.

El diagnóstico es fundamentalmente clínico aunque se puede intentar cultivar el agente etiológico a partir de un aspirado o biopsia de la lesión, y en algunas ocasiones de la sangre.

Fascitis: cuando la destrucción del tejido avanza hacia las fascias musculares se denomina fascitis, y responde generalmente a una infección mixta por aerobios y anaerobios estrictos. La fascitis necrotizante es una infección grave debida a la rápida progresión destructiva de la enfermedad y la posible infección microbiana del torrente sanguíneo.

Gangrena: se denomina gangrena a todas las infecciones que producen necrosis extensa de la piel y del tejido celular subcutáneo. La gangrena gaseosa se debe a la acción de una exotoxina producida por *Clostridium perfringes*, el cual penetra en el tejido subcutáneo y llega hasta los músculos.

- Infecciones de lesiones cutáneas preexistentes.

Las lesiones de la piel vulneran uno de sus principales mecanismos de defensa, que es su integridad, lo que junto a la presencia de tejido

necrótico, la pobre irrigación de la zona dañada y otras circunstancias, crea un ambiente propicio para el desarrollo de las infecciones. A veces la infección se limita a la herida propiamente dicha, pero en otros casos ésta actúa a su vez como puerta de entrada para microorganismos que ocasionan distancia o de tipo más generalizado.

- Infecciones de heridas quirúrgicas: generalmente se produce un exudado purulento, útil para el cultivo, y en ocasiones pueden aparecer síntomas y signos de infección sistémica. Entre los agentes etiológicos es frecuente *Staphylococcus aureus*, generalmente resistente a penicilina y meticilina, procedente en muchas ocasiones de la propia microbiota normal de la piel del paciente o del personal sanitario que lo atiende. También pueden encontrarse bacilos Gram negativos, fundamentalmente *Escherichia coli*, u otros microorganismos dependiendo en gran medida de la localización de la herida. Los anaerobios procedentes del intestino grueso del paciente pueden penetrar en el campo operatorio y ocasionar graves infecciones mixtas. Existe la posibilidad de que *Bacteroides fragilis* y menos frecuentemente *Clostridium perfringes* penetren en el torrente sanguíneo y causen una infección postoperatoria

generalizada que a menudo es mortal.

- Heridas causadas por mordeduras: pueden infectarse por microorganismos procedentes de la microbiota oral; cabe destacar la infección causada por *Pasteurella multocida* tras la mordedura de animales como gatos y leones, donde puede encontrarse dicho microorganismo.
- Heridas producidas por quemaduras: dejan la superficie corporal desprotegida y constituyen un excelente medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos que pueden causar infección. El riesgo y la importancia de la misma dependerá de la extensión del área afectada y los microorganismos pueden llegar a invadir los tejidos subyacentes e incluso pasar a la sangre. Entre los patógenos que se aíslan de estas infecciones cabe destacar *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; el primero como agente etiológico más frecuente y el segundo por la gravedad del cuadro clínico que origina sobre todo en pacientes con alguna inmunodeficiencia. También pueden ser los causantes varios estreptococos β -hemolíticos, pero sobre todo *Streptococcus pyogenes* (β -hemolítico del grupo A), que se considera otro patógeno clásico en

enfermos quemados y se caracteriza por una invasividad importante de las heridas. La infección se caracteriza por la aparición de un exudado purulento que puede utilizarse como muestra para el cultivo del agente etiológico.

Diagnóstico de las infecciones de la piel y de otras lesiones purulentas.

Las infecciones purulentas de la piel resultan de fácil acceso y en general no hay dificultad para obtener las muestras necesarias para el examen microscópico y el cultivo.

⇒ En las infecciones no purulentas, como celulitis y erisipela, es posible obtener un espécimen diagnóstico por medio de previa limpieza con solución desinfectante, aspirando el área de inflamación más activa (generalmente el borde de la misma) con aguja No. 25 unida a una jeringuilla con 0,2 mL de solución salina estéril. Si con la aspiración inicial no se obtiene el espécimen, inyectar la solución salina y volver a aspirar. Colocar una gota de la muestra en un portaobjetos para efectuar la coloración de Gram y reservar el resto para el cultivo.

⇒ En las lesiones abiertas hay dificultad, debido a la colonización de patógenos y saprófitos. En estos casos se recomienda tomar la muestra del centro de la lesión y no del borde.

⇒ En las lesiones bacterianas de la piel y en infecciones de

heridas profundas, la aspiración por medio de una aguja del área sospechosa ofrece escasos riesgos y brinda información de suma importancia diagnóstica y terapéutica.

⇒ Infecciones producidas por hongos: en estos casos es imposible establecer el diagnóstico por aspiración por aguja, por lo que se deberá recurrir a una biopsia. Los cultivos cuantitativos de la biopsia de tejido del sitio de una quemadura son útiles para determinar la presencia de una infección sobreañadida.

⇒ En caso de biopsia para cultivo bacteriológico, se procederá de la siguiente manera:

- Colocar el fragmento de tejido en mortero estéril mediante una pinza de disección estéril.
- Añadir unas gotas de agua destilada o solución salina estériles. Macerar enérgicamente hasta obtener una mezcla homogénea.
- Realizar frotis en una lámina portaobjetos y colorear mediante tinción de Gram.
- Inocular en medios sólidos y líquidos: agar sangre, agar chocolate, Agar Mac Conkey, y Thioglicolato.
- Incubar a 35°C durante 24 horas, si el resultado es negativo, incubar hasta 72 horas.

- Es importante buscar anaerobios.

⇒ Absceso: la recogida de pus y fragmentos de tejido del absceso requiere de una técnica quirúrgica. Hay que aspirar la mayor cantidad posible de material purulento con jeringuilla y aguja, el material se traslada a un recipiente estéril en condiciones de asepsia. Si no se dispone de recipientes para muestras, se deja el pus en la jeringuilla con la aguja tapada y se transporta al laboratorio, procesándose tan pronto llegue al mismo. El uso de hisopo solo está justificado cuando hay que recoger cantidades muy pequeñas de pus u obtener muestras de sitios delicados. Cuando haya que recoger fragmentos tisulares de la pared del absceso se procederá como se describe en biopsias.

⇒ Trayectos fistulosos o ganglios linfáticos supurados: cuando sale pus de una fístula o de un ganglio linfático abierto debe recogerse cuidadosamente el material con una pipeta de Pasteur estéril y depositarlo en un tubo de ensayo estéril.

⇒ Otros líquidos corporales: existen dos factores de gran importancia y que hay que tener en cuenta para una adecuada toma de este tipo de muestra y es la prevención de

la contaminación de la misma con la microbiota normal de la piel y la obtención de cantidades suficientes de material para desarrollar las pruebas requeridas. Los líquidos sinovial, pleural y pericárdico suelen ser tan viscosos que los ensayos de aglutinación para buscar antígenos bacterianos son imposibles de leer. En tales casos, la dilución, extracción o pretratamiento de las muestras para reducir esta viscosidad son medidas que pueden ser consideradas.

Toma de muestra:

- Para la toma de muestra se debe usar material estéril.
- La punción debe ser practicada por el médico.
- No colocar la muestra en la nevera ni en incubadora, debe sembrarse inmediatamente.
- Si el volumen de la muestra es de más de 1ml se debe proceder a centrifugar en frasco estéril durante 30 minutos a 2500 rpm. Luego con pipeta de Pasteur se extrae el sobrenadante, el cual se puede utilizar para realizar pruebas de detección de antígenos bacterianos (látex).
- Se realiza frotis con el sedimento para colorear mediante la tinción de Gram.
- Sembrar el sedimento en los medios sólidos y para

sembrar en medios líquidos volver a unir sedimento y sobrenadante y verterlo en el frasco.

⇒ Biopsia de quemadura: debe ser tomada por el personal médico:

Superficie:

- Elimine el agente tópico con una gasa empapada en solución salina estéril.
- Tome una muestra de superficie, empleando un hisopo humedecido estéril, colocar inmediatamente en un medio de transporte para procesarla cuanto antes.

Biopsia:

- Limpie ahora superficie con solución yodada realizando movimientos circulares de adentro hacia fuera utilizando 2 ó 3 torundas de algodón. Dejar secar espontáneamente.
- Tomar un fragmento de biopsia más con la suficiente profundidad que permita obtener una pequeña porción por debajo de la línea grasa no quemada. La biopsia se toma practicando 2 incisiones paralelas de 1-2 cm. de largo.
- El espécimen se levanta con las pinzas y se corta desde el tejido celular subcutáneo a la suficiente profundidad que permita obtener una pequeña porción por debajo de la línea grasa no quemada. La muestra

debe pesar 0,02-0,05g. Esta técnica rara vez produce sangrado que no pueda ser controlado con presión digital. La anestesia local no es necesaria porque algunos de estos agentes utilizan soluciones bacteriostáticas que pueden inhibir el crecimiento.

- Colocar la biopsia en una caja Petri o tubo estéril sin nutrientes para transportarla al laboratorio.
- Se debe procesar la muestra en un lapso de tiempo no mayor de 2 horas.

Procesamiento de las muestras.

En general, las muestras purulentas deben ser examinadas directamente y los líquidos claros deben ser centrifugados a 1500 g por 15 minutos.

Examen macroscópico: es difícil evaluar microscópicamente las muestras de pus o exudado de heridas recogidas con hisopo, en particular si éste se sumerge en un medio de transporte. Las muestras de pus que llegan al laboratorio en jeringuilla o recipiente estéril deben examinarse cuidadosamente (consistencia, color, olor, etc.)

- a) Color: el color del pus varía entre amarillo-verdoso y rojo parduzco. En caso de infecciones por *P. aeruginosa* puede verse teñido de verde azulado debido a la presencia de piocianina.

- b) Consistencia: depende del agente causal de la infección, variando entre exudado seroso hasta ser pus verdadero.
- c) Olor: el olor nauseabundo, es uno de los rasgos más característicos de las infecciones por anaerobios y de las infecciones mixtas por anaerobios y aerobios, aunque a veces puede faltar.

Examen microscópico: en cada muestra debe prepararse un frotis teñido por coloración de Gram. A petición del clínico podrá hacerse coloración por la técnica de Ziehl-Neelsen.

Técnica para la coloración de Gram: con el asa de platino se toma la porción más purulenta de la muestra y se hace una extensión uniforme sobre un portaobjetos limpio. Examinar cuidadosamente buscando la presencia de:

- Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.
- Bacterias: morfología y agrupación.
- Levaduras.

Los gránulos amarillos en flor de azufre que son colonias de *A. israelii* o los granos de micetoma se deben aplastar sobre un portaobjetos, teñir con Gram y examinar en busca de filamentos Gram positivos. Ramificados y fragmentados.

Independientemente de los resultados de los exámenes macro

y microscópico las muestras deben ser inoculadas en los medios: Agar sangre, Agar chocolate, Agar sangre anaeróbico, y agar entérico incubado aeróbicamente (Mac Conkey, EMB), caldo de enriquecimiento (BHI, Thioglicolato). Añadir 0,5 mL del sedimento a Agar Sabouraud.

Se incuban a 35°C durante 2 días inoculando directamente dentro de frascos para Hemocultivos, para trabajarse como tal, examinando a diario en busca de desarrollo microbiano. En caso de los medios líquidos se les realiza coloración de Gram y resiembra en los medios apropiados.

Cultivo de biopsias de quemados:

Manejo de interpretación:

Muestra de superficie:

Se incuba a 37°C durante 24 a 48 horas. Revisar los cultivos e interpretar como abundantes, moderados, leves o escasos. No se recomienda hacer recuentos cuantitativos, pero sí identificaciones sin pruebas de susceptibilidad.

Biopsia semi-cuantitativa.

- Coloración de Gram: en este tipo de muestras la interpretación del examen directo del material teñido

es difícil. El elevado contenido de detritos celulares y el escaso número de organismos en las muestras no permite su diferenciación (ya que son localizaciones donde existe una microbiota normal). Por esta razón el procedimiento más valioso para el diagnóstico en estos casos es el cultivo microbiológico.

Muestra:

1. Pese primero la placa estéril.
2. Luego pese la placa con la biopsia.
3. Macere el tejido o córtelo en tiras finas con bisturí estéril.
4. Suspenda el macerado en 2 mL de sol. sal. estéril
5. Prepare una serie de tubos con diluciones del orden de 10. las biopsias a pacientes por primera vez o un resultado negativo anterior, se hacen diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} . A pacientes con biopsia previa positiva se le realizan diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} .

Cultivo:

0,1 mL de cada dilución debe ser sembrado en agar sangre y EMB ó Mc Conkey, estriarse con espátula de Drigalski e incubarse a 35-

37°C por 24 horas para después realizar el recuento.

Recuento:

La placa con un crecimiento leve o moderado se selecciona para el recuento. Cada colonia representa un microorganismo de esa dilución.

La colonización de la herida puede ser cuantitativa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Org. x g de tej.} = \frac{N \times D \times 2 \times 10}{P}$$

Donde:

N = # de col. en la placa escogida.

D = Dilución inoculada.

P = Peso de la biopsia en gramos.

2= Suspensión original en sol. sal.

10= Dilución al inocular la muestra en la placa.

La identificación y el antibiograma deben efectuarse para completar el análisis.

Para anaerobios: se inocula 1 mL de la dilución inicial a caldo Tioglicolato y se examina en condiciones de anaerobiosis.

Interpretación:

Los cultivos que proporcionen 10^5 ó más gérmenes por gramo de tejido se consideran que representa una infección invasora.

Indicaciones del cultivo del líquido pleural y ascítico

- Septicemia
- Causa desconocida

Líquido pleural

Si después de una valoración clínica del paciente que presenta un derrame pleural se sospecha alguna de las causas de infección pleural resumidas a continuación, se procederá a la práctica de una toracocentesis, con las máximas condiciones de asepsia y antes de la toma de tratamiento antimicrobiano, extrayéndose, si es posible, entre 30 y 50 mL. de líquido pleural. Siguiendo las indicaciones de la figura de estudio microbiológico del líquido pleural se reservarán entre 5 y 15 mL., inoculándose en uno o dos viales de hemocultivos, preferentemente en el vial anaerobio, y el resto se depositará en un tubo de rosca estéril.

Causas asociadas a la infección de la cavidad pleural Infección pulmonar

Neumonía

Bronquiectasias

Absceso pulmonar

Tuberculosis

Otras infecciones torácicas

- Perforación esofágica
- Absceso paravertebral
- Traumatismo penetrante:
Postquirúrgico,
Postinstrumentación

Infecciones subdiafragmáticas

- Absceso subfrénico
- Absceso perinefrítico
- Peritonitis
- Absceso hepático

Empiema

Etiología

Ante un empiema pleural los microorganismos más frecuentemente aislados son los anaerobios solos o asociados a aerobios fundamentalmente *Streptococcus spp.* y bacilos gramnegativos (enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*), relacionándose fundamentalmente con la neumonía aspirativa y el absceso pulmonar. El aislamiento de neumococo es infrecuente ya que menos del 5 % de las neumonías neumocócicas desarrollan un empiema. *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* se encuentran sobre todo en niños y además *S. aureus* se asocia a infección pleural postraumatismo o cirugía torácica. En pacientes inmunodeprimidos se aíslan más a menudo bacilos gramnegativos y hongos. Se sospechará *Entamoeba histolytica* en presencia de un absceso hepático después de un viaje a un país endémico.

Examen microscópico

La tinción de Gram es de gran utilidad, sobre todo en los empiemas en los que coexisten varias especies bacterianas (aerobias y anaerobias) y en los que el cultivo no suele reflejar

todos los microorganismos presentes en la muestra. A continuación se relacionan otros tipos de exámenes microscópicos menos habituales, según el agente etiológico a investigar.

Examen microscópico.

Indicación

-Tinción de naranja de acridina:

- Complementa a la tinción de Gram

-Examen en fresco con tinta china:

- *Cryptococcus neoformans*

-Tinción de metenamina plata o Inmunofluorescencia:

- *Pneumocystis carinii*

-Examen en fresco o tinción de Giemsa:

- Parásitos

-Examen en fresco con hidróxido potásico:

- Hongos

-Tinción de Kinyoun:

- *Nocardia* spp.

-Inmunofluorescencia directa:

- *Legionella* spp.

Cultivo

Se requiere un mínimo de 24-48 horas para los microorganismos aerobios, de cuatro días para los anaerobios, y en caso de sospecha de *Legionella* spp., *Nocardia* spp. y hongos, la incubación debe prolongarse más de una semana.

Derrame pleural tuberculoso

La pleuritis tuberculosa representa el 30% de las manifestaciones de esta enfermedad y en nuestro país es la causa mas frecuente de derrame pleural en menores de 35 años.

El derrame pleural secundario a *Mycobacterium tuberculosis* suele presentarse como un exudado con predominio linfocitario, aunque en las dos primeras semanas puede también existir un empiema con neutrofilia franca.

Examen microscópico

La baciloscopía con técnica de auramina o Ziehl- Neelsen sólo detecta aproximadamente un 5 % de las muestras con cultivo positivo.

Cultivo

Las muestras se sembrarán en el medio clásico de Löwenstein - Jensen o en viales del sistema radiométrico, que detectan crecimiento bacteriano en menos tiempo que el sistema clásico, que debe incubarse como mínimo dos meses y en el que *M. tuberculosis* suele crecer a partir de la tercera semana.

Exámenes complementarios

Podría estar indicada la práctica de un hemocultivo y de cultivos de esputo u otras secreciones respiratorias. La detección de antígeno de *Cryptococcus neoformans* en líquido pleural y en suero puede ser de utilidad en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

La utilización de técnicas rápidas de detección de antígeno de *Streptococcus pneumoniae* y de *Haemophilus influenzae* en líquido pleural tiene escasa rentabilidad.

La determinación de anticuerpos a *Mycoplasma pneumoniae*,

Legionella pneumophila, *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetii* y virus, puede orientar etiológicamente una neumonía, aunque en estos casos, excepto *L. pneumophila*, el derrame pleural suele ser poco relevante.

Líquido ascítico

La paracentesis es aconsejable para el diagnóstico diferencial de todo paciente con ascitis de nueva instauración y en pacientes que, con ascitis previa, experimentan un cambio en su estado general. El cultivo del líquido obtenido es esencial puesto que la peritonitis bacteriana espontánea es una de las complicaciones graves de la ascitis. Incluso en pacientes en los que exista una causa obvia que justifique la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal es conveniente hacer un estudio microbiológico para descartar la posibilidad de que exista una infección sobreañadida.

Obtención de la muestra

Se obtendrá siempre por punción, con técnica aséptica y si es posible antes de iniciar el tratamiento antibiótico. En caso de infección confirmada es recomendable repetir la paracentesis y el análisis completo del líquido a las 72 horas de instaurar el tratamiento para valorar la respuesta.

Examen microscópico

El líquido ascítico normal posee actividad bactericida especialmente eficaz frente a

gramnegativos. En consecuencia, la cantidad de microorganismos de una muestra puede ser muy pequeña, sobre todo en las peritonitis primarias. En estos casos la observación microscópica (tinción de Gram) suele ser infructuosa o bien se observa un solo tipo de microorganismos.

Por el contrario, cuando se trata de una peritonitis secundaria la entrada masiva de microorganismos hace posible que éstos se encuentren en el líquido ascítico en cantidades elevadas. El examen microscópico en estos casos suele ser positivo y se pueden apreciar distintos tipos de microorganismos. En los pacientes en que la clínica no permita diferenciar con claridad si se trata de una peritonitis primaria o secundaria, la tinción de Gram del líquido ascítico constituye una prueba rápida de gran valor para el diagnóstico diferencial. Ante una sospecha de peritonitis tuberculosa la tinción de Ziehl-Neelsen del líquido ascítico tiene muy baja sensibilidad por lo que no es útil para el diagnóstico.

Cultivo

Los resultados del recuento celular y el cultivo permiten establecer las cuatro categorías de: ascitis, bacterascitis, peritonitis y ascitis neutrocítica con cultivo negativo.

Para el cultivo es recomendable emplear volúmenes de muestra grandes para obtener buenos resultados microbiológicos.

En la cabecera del enfermo se inocularán de 10 a 15 mL de muestra repartidos entre dos frascos con medio de cultivo líquido (aerobio y anaerobio), de los destinados habitualmente para hemocultivos.

La porción de muestra destinada a examen microscópico también se cultivará, en medios sólidos, para hacer una estimación cuantitativa e identificar los cultivos como puros o mixtos. En todos los casos se recomienda la práctica simultánea de hemocultivos para

aumentar las posibilidades diagnósticas (40%-70% positivos).

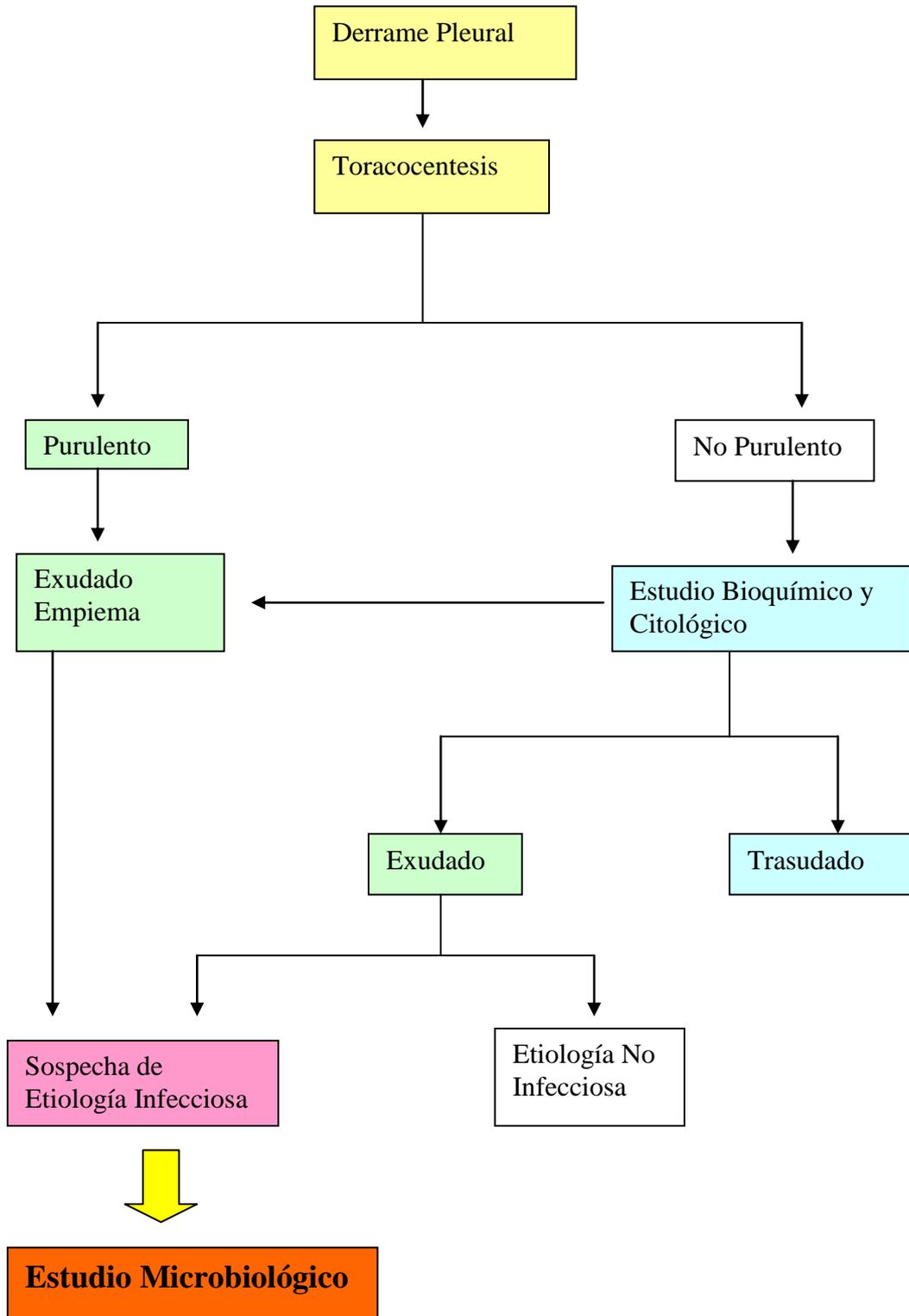
Si se quiere recurrir al cultivo del líquido ascítico éste debe inocularse en medios líquidos especiales para el aislamiento de *Mycobacterium*.

El crecimiento de las bacterias que con mayor frecuencia son causa de peritonitis requiere un mínimo de 17-24 horas y su identificación

y antibiograma otro día más. Las especies implicadas varían, dependiendo

de si se trata de una peritonitis primaria o secundaria. En el caso de las peritonitis primarias es muy rara la participación de especies anaerobias y los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia son *E. coli* y *S. pneumoniae*. En las peritonitis secundarias predominan las asociaciones de especies aerobias y anaerobias.

Algoritmo #22. Estudio microbiológico del líquido pleural.



Tomado de: Ferrer Marcellés, A y Gasser Laguna, I.: Indicaciones del cultivo del líquido Pleural y Ascítico. Medicine 1998. 7(78):3644-3646.

Estudio del catéter en el laboratorio de microbiología.

Introducción:

El incremento de la utilización de catéteres intravasculares para la administración de medicamentos ha creado una clase de infección nosocomial de importancia creciente ya que la bacteriemia intermitente o la franca sepsis originada por los m.o. que colonizan la superficie y el interior de los catéteres intravenosos es un fenómeno que ocurre frecuentemente hoy en los hospitales.

La infección del torrente sanguíneo se clasifica como primaria cuando la bacteriemia ocurre en ausencia de ningún otro sitio de infección conocido y como secundaria cuando resulta de una infección existente que disemina a la sangre. La infección nosocomial primaria está usualmente relacionada con los dispositivos de terapia intravenosa y es prevenible en gran medida. Estas cánulas insertadas dentro del sistema vascular rompen las defensas normales de la piel y proporcionan una ruta potencial de entrada de m.o y lo que es causa de infecciones. Una película de fibrina se forma alrededor de la porción intravenosa de la cánula muy pronto después de la inserción, lo cual proporciona un sitio para la replicación de los m.o que pueden ser introducidos de la propia microbiota

normal del paciente o de las manos del personal del hospital durante el proceder invasivo. Las infecciones relacionadas con la terapia intravenosa pueden ser también consecuencia de la infusión de fluidos contaminados. Generalmente las infecciones asociadas con cánulas contaminadas son endémicas, mientras que las relacionadas con fluidos contaminados son más comúnmente asociadas con epidemias.

Los patógenos más frecuentes son:

1. *Estafilococos coagulasa negativa*,
2. *S. aureus*
3. *Enterococos*.

En pacientes neutropénicos los m.o más frecuentes son:

1. *Pseudomonas*.
2. *Estafilococos coagulasa negativa y positiva*.
3. Hongos (*Cándidas*).

Toma de muestra.

Para realizar el estudio completo de la sepsis por catéter se deben analizar tanto el extremo intravenoso del catéter como la extremidad distal, el

líquido de infusión, la piel del paciente tomando muestra del sitio de inserción de la cánula y la sangre, obtenida del brazo contralateral al sitio de inserción del catéter. Todo ello en el momento de extracción del catéter.

El método de cultivo semicuantitativo desarrollado por Maki y colaboradores establece un proceder seguro que permite establecer el diagnóstico rápido, el cual describiremos a continuación.

1. Antes de extraer el catéter se debe descontaminar la piel.
2. Una vez extraído el catéter, se debe cortar más o menos 6 cm. de la parte distal del mismo y a 1-2 cm. del segmento de unión piel-catéter.
3. Colocar en tubo seco y enviar inmediatamente el laboratorio.
4. Con pinza estéril se coloca el catéter en una placa de agar sangre y rotar 4-5 veces sobre la superficie del agar en 4 direcciones.
5. Incubar las placas inoculadas a 35°C durante 48 horas en aerobiosis.
6. Con una aguja extraiga parte del contenido interno del catéter y deposítelo en una lámina portaobjetos para colorear con Gram.
7. El resto se inocula en medio líquido (Tioglicolato), sin embargo, los gérmenes presentes no se consideran significativos.

Nota: el catéter se debe procesar de inmediato en el laboratorio y nunca deben pasar más de 2 horas sin sembrar. Refrigerar hasta el momento de la siembra.

Interpretación microscópica: se determinan categorías con respecto al Gram.

- a) Negativo: no se observan bacterias.
- b) 1 X: se observan de 1 a 5 bacterias en toda la preparación.
- c) 2 X: se observa 1 organismo por cada 20 campos de inmersión.
- d) 3 X: se observa 1 organismo por cada 5 campos ó 1 o más campos con 10 a 25 organismos.
- e) 4X: 1 ó más campos con organismos presentes en cantidad abundante.

Interpretación del cultivo: la presencia de más de 15 colonias por placa de inoculación se relaciona fuertemente con inflamación local y bacteriemia asociada al catéter (ver cuadro en la siguiente página). Debe hacerse identificación y antibiograma de los gérmenes presentes.

Conclusiones según los resultados del estudio del catéter.

Piel	Ext. Distal	Ext. Intravenoso	Hemoc.	Liq. Infusión	Resultado Final.
Negativo	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Estéril.
Negativo	Negativo.	Menos de 15 UFC	Negativo.	Negativo.	Colonizado
Positivo.	Positivo.	Más de 15 UFC	Positivo	Negativo	Bacteriemia por catéter.
Negativo	Negativo	Más de 15 UFC	Positivo	Negativo	Bacteriemia de otro origen.
Negativo	Negativo	Más de 15 UFC	Positivo	Positivo	Bacteriemia por líquido Infusión.

DIAGNÓSTICO POR BACILOSCOPIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR:

Según MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS en el PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA TUBERCULOSIS del MINSAP, 1999.

Toma de muestra: instruir al paciente que debe recoger una secreción bronquial obtenida después de un esfuerzo de tos (nunca la que se obtiene de faringe o por aspiración de secreciones nasales o saliva). Debe realizarse al levantarse previo aseo bucal convencional. la cantidad a recolectar es de 4-10 mL en un frasco estéril de boca ancha, con tapa de rosca, pared lisa y preferentemente de color ámbar. Se rotulará en el propio frasco (no en la tapa) con el nombre y apellidos del paciente. La toma de muestra debe realizarse en un área ventilada y preferiblemente abierta.

Transporte y conservación: Se transportará en un container hermético y esterilizable. Las muestras que no puedan ser trasladadas de inmediato, deben conservarse a temperatura de refrigeración (4- 8° C) por un término de 72 horas.

No aceptar muestras no útiles (saliva, muestras derramadas, escasas y secas, no rotulados).

Procedimientos e identificación.

BACILOSCOPIA.

1. Extensión del frotis:

- seleccionar con el asa una partícula de la parte más purulenta de la muestra.
- Extender la muestra seleccionada en 2]3 de un portaobjeto de manera que el material quede lo más fina posible y homogéneamente distribuido y que ocupe no menos del 60% de la superficie.
- Utilizar el tercio restante para su identificación.
- Secar al aire y fijar a la llama por la parte opuesta.

2. Coloración:

- Cubrir la extensión con la Fuschina básica fenicada.
- Calentar por la cara opuesta hasta la emisión de vapores evitando que hierva.
- Lavar con agua y colorear con alcohol ácido al 3% ó ácido sulfúrico al 20% durante 2 minutos. Lavar. Puede volverse a decolorar si la lámina queda muy rojiza.
- Lavar con agua y colorear con azul de metileno al 0,1% durante 30 segundos.
- Lavar y secar al aire.

3. Observación microscópica.

- Usar lente objetivo de inmersión para lograr aumentos aproximados de 700x.
- Observar campo a campo, 2 líneas horizontales y 2 verticales a partir de una horizontal (aproximadamente 300 campos)
- Sumar los bacilos encontrados en el recorrido, sin ser necesario contar más de 25 bacilos y codificar de la siguiente manera:

Tabla #6

# de BACILOS	CODIFICACIÓN
0 en la 4 líneas	0
1-5 en las 4 líneas	El propio #
6-24 en las 4 líneas	6
25 ó más en las 4 líneas	7
25 ó más en 1 línea	8
Bacilos en la mayoría de los campos	9

Tomado de: MINSAP: Manual de Normas y Procedimientos en el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Cuba, 1999.

1. MUESTRAS DE ESPUTO NO BAAR.

- ♦ Orientar al paciente que debe recoger la primera expectoración de la mañana, previo aseo bucal, y precedido de un fuerte golpe de tos. No debe ser saliva ni descarga nasofaríngea. Se recogerá en frasco estéril, de boca ancha, con tapa ajustada y segura.

Evaluación de esputos por Gram..

A- Se prepara el frotis de la manera habitual, se le realiza coloración de Gram y se observa con ocular 10X y objetivo de 100.

1. Observar el número de leucocitos polimorfo nucleares:

No. de leucocitos	Valor
Menos de 10	0
De 10 a 25	+1
Más de 25	+2
Presencia de moco	+1

2. Observar el número de células epiteliales por campo.

No. de células epiteliales	Valor
De 10 a 25	-1
Más de 25	-2

3. Promedie el número de células y leucocitos en 20-30 campos. Calcule el total.

- ❖ Si el resultado final es 0 ó menos: Indica ausencia de

actividad inflamatoria o
contaminación con saliva.

B- Esquema de Murray y
Washington:

Tabla #7

Grupo	Células epiteliales objetivo 100X	Leucocitos PMN objetivo 100X
1	Más de 25	Menos de 10
2	Más de 25	10 a 25
3	Más de 25	Más de 25
4	10 a 25	Más de 25
5	Menos de 10	Más de 25

Tomado de: Malagón Londoño y Cols.:
Infecciones Intrahospitalarias. 1995. Cap. XV.

- ❖ La gran cantidad de células epiteliales en los grupos 1-4 indica contaminación con orofaringe e invalida la muestra.
- ❖ Sólo las muestras del Grupo 5 son consideradas como esputo.

Bibliografía:

1. Bryant RE, Salmon CJ. Pleural empyema. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 747-764.
2. Burnett G, Shuster G. Microbiología oral y enfermedades infecciosas. Williams Wilkins Company, Baltimore, 1981.
3. Ferrer Marcellés A y Gasser Laguna I. Indicaciones del cultivo del líquido Pleural y Ascítico. *Medicine* 1998. 7(78):3644-3646.
4. Finegold S, Martin W, Scout E. Diagnóstico Microbiológico Bailey y Scott. 1990.
5. Gardner P, Provine H. Manual de infecciones bacterianas. Litter, Brown Company, Boston, 1985.
6. Gómez-Jiménez J, Ribera E, Martínez-Vázquez JM, Passer I, Segura RM. Peritonitis bacteriana del cirrótico. Estudio prospectivo de 80 episodios. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 493-497.
7. Habeeb KS, Herrera JL. Management of Ascitis. Paracentesis as a Guide. *Postgrad Med* 1997;101: 191-192, 195-200.
8. Haro M, Ruiz-Manzano J, Gallego M, Abad J, Manterota JM, Morera J. Tuberculosis pleural: análisis de 105 casos.
9. Lennette B, Truant H. Manual of Clinical Microbiology. Quinta Edición, American Society for Microbiology, 1991.
10. Malagón Londoño y Cols.: Infecciones Intrahospitalarias. 1995. Cap. XV p 403, 419-22.
11. MINSAP: Manual de Normas y Procedimientos en el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Cuba, 1999.
12. Shakil AO, Korula J, Kanel GC, Murray NGB, Reynolds TB. Diagnostic Features of Tuberculous Peritonitis in the Absence and Presence of Chronic Liver Disease: A Case Control Study. *Am J Med* 1996; 100: 179-185.