

## **Tema 8.- Antibiograma, Urocultivo, Coprocultivo y Hemocultivo.**

### **Valoración de los Antibióticos, Antibiograma**

La sensibilidad microbiana a varios fármacos antimicrobianos puede ser determinada mediante pruebas basadas en la dilución en tubo, en agar difusión en disco o mediciones automatizadas de proliferación.

Los dos últimos tipos son los más empleados por su rapidez y simplicidad.

Para que tengan validez, las pruebas de sensibilidad microbiana tienen que ser estandarizadas rígidamente y practicadas con cultivos puros.

Así pues, el antibiograma se define como el estudio de las sensibilidades de las diferentes bacterias frente a los antibióticos.

#### **Método de dilución en tubo:**

Se preparan diluciones progresivamente decrecientes del antibiótico en una serie de tubos con medio líquido (caldo), añadiendo seguidamente a todos ellos una cantidad fija del germen a estudiar. Después de añadir el inóculo estándar del microorganismo, se incuba el cultivo durante 18 a 24 horas a 37°C. El tubo que contiene la máxima dilución del fármaco y que no presenta turbidez define la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) de dicho agente.

Un procedimiento alternativo es la Prueba de dilución en agar, que se practica con placas de agar, cada una de las cuales contiene una dilución seriada del fármaco antimicrobiano.

#### **Método de difusión de disco o disco-placa:**

Es el más utilizado, el más simple y económico; estas pruebas emplean discos de papel de filtro estandarizados impregnados con cantidades fijas de antibióticos. Se preparan placas de petri con agar MUELLER-HINTON (Es el medio que se utiliza en todos los antibiogramas), sembrándose un césped de bacterias en la superficie de dicha placa para un crecimiento semiconfluyente; se dejan secar las placas y se colocan los discos de antibióticos con pinzas o con dispositivos automáticos (normalmente 6 por placa).

Tras 18-24 horas de incubación a 37°C se procede a la lectura midiendo con una regla milimetrada los halos de inhibición, si existen, clasificando a las cepas como sensibles, intermedia o resistente.

#### **Pruebas automatizadas:**

Se trata de medir el efecto inhibitor de los antibióticos, en medio líquido, midiendo la turbidez, mediante el uso de la dispersión luminosa para determinar el crecimiento microbiano en un tiempo estándar; con esta técnica se obtienen resultados rápidos.

## Urocultivo

**Concepto:** Es el cultivo de orina.

**Recogida de muestra.**

**Medios de cultivo empleados:**

- 1.- CLED
- 2.- Mueller Hinton
- 3.- Cled y Mac-Conkey y Agar Chocolate (para aislamiento)

En caso de sospecha de una infección tuberculosa renal, hay que realizar un Ziehl-Nielsen y siembra en medios para mycobacterium tuberculosis (Lowenstein Jensen)

**Concepto de infección urinaria:**

La orina normalmente debe ser un líquido estéril. Se considera **infección** cuando la orina presenta **100.000 o más UFC por ml** (unidades formadoras de colonias) y se considera **contaminación** cuando **presenta 10.000 UFC o menos por ml** de orina, o cuando existen varias colonias distintas en el mismo cultivo (flora mixta). En este caso se debe repetir el urocultivo.

**Gérmens más frecuentes productores de infecciones urinarias:**

- 1.- **Escherichia coli**
- 2.- Klebsiella
- 3.- Proteus
- 4.- Pseudomonas
- 5.- Stafilococos aureus
- 6.- Streptococos faecalis
- 7.- Serratia
- 8.- Candida albicans

No siempre la existencia de 100.000 UFC/ml es necesaria para producir una infección urinaria. Si el cultivo es de **estafilococos aureus** son suficientes 10.000 UFC/ml para que se considere infección y si es de **Candida albicans** 1.000 a 2.000 UFC/ml.

**Métodos para el recuento de bacterias:**

Se realiza por dos técnicas:

1. Dilución en placa.
- 2.- Extensión en superficie o técnica del asa calibrada.

1.- **DILUCIÓN EN PLACA:** 0,1ml de orina se añade a 9,9 ml de agua estéril, y 0,1 ml de esta dilución se pone en una placa de Petri.

Se añade ahora 10 a 20 ml de medio de cultivo fluidificado a 45° C. Se mezcla y se deja solidificar.

Se incuba 24h a 37°C y una colonia representa 1.000 UFC/ml de orina

2.- **EXTENSIÓN EN SUPERFICIE:** Es la más empleada. Se utiliza un asa calibrada a 0,001 ml. Se toma la muestra sumergiéndola en la orina y con ella se extiende por la superficie del medio sólido (CLED, etc). Se incuba 24h a 37°C. Cada colonia representa 1000 UFC/ml de orina.

Las asas para urocultivo no deben emplearse para otras muestras.

## Coprocultivo

**Concepto:** Cultivo de heces.

**Recogida de muestras.**

**Medios de cultivo empleados:** 1.- Mac Conkey

2.- SS

3.- Agar Sal Manitol o Chapman

4.- Selenito

5.- Saboureaud

6.- Agar Campyloset (Campylobacter) o Agar de Preston (el medio lleva carbón y es negro, las colonias oxidasas positivas son grises). El Campylobacter es oxidasas positivo.

7.- Agar Sangre

8.- TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa) Ante sospecha de cólera.

Otros medios que pueden emplearse son: Agar Hektoen, Agar EMB, Agar Yersinia CIN (Cefsulodine, Irgasan, Novobiocina) y CCFA (Cicloserina, Cefoxitina, Fructosa, Agar) para Clostridium difficile.

**Gérmenes patógenos más importantes aislados en coprocultivos:**

1.- Salmonellas: (Fiebres Tifoideas, Paratíficas y Gastroenteritis por toxiinfecciones alimentarias).

2.- Shigellas – Disenteria bacilar (diarreas con moco, sangre y pus)

3.- Yersinia enterocolitica – Enterocolitis agudas

4.- Campylobacter – Enteritis

5.- Estafilococo Aureus – Toxiinfecciones alimentarias

6.- Pseudomona aeruginosa

7.- Candida albicans

8.- Escherichia coli Enteropatógenos

9.- Vibrio cólera

10.- Rotavirus (Serología) – Diarreas en niños.

11.- Giardia Lamblia (Técnicas de sedimentación o flotación para parásitos o huevos de parásitos en heces).

**Esquema clásico de un coprocultivo:**

1 – Tomar con un escobillón estéril o un asa de platino, un poco de heces y emulsionarla en un tubo con 4 ml de agua destilada estéril o en agua de peptona.

2 – Dejar en contacto 5 a 10 minutos a Tª ambiente.

3 – De esta dilución, se siembra con el asa de platino en los medios adecuados.

### Investigación de Rotavirus en heces.

Se hace mediante la prueba al latex.

**Fundamento.**

Las partículas de latex sensibilizadas con un Ac específico se ponen en contacto con el Ag presente en las heces. La reacción se detecta por una aglutinación que aparece en 2 minutos.

**Técnica.**

1.- Hacer una emulsión de 0,2 gr de heces en 2 ml de tampón o agua destilada estéril.

2.- Dejar en contacto 5-10 minutos y centrifugar 10 minutos a 800 r.p.m.

3.- Colocar en un porta una gota de latex sensibilizado con el Ac y otra gota del sobrenadante de centrifugación.

4 – Mezclar ambas gotas.

5 – La aparición de aglutinación en 2 minutos indica presencia de Rotavirus.

Es conveniente utilizar un control negativo.

## Hemocultivo

**Concepto:** Cultivo de sangre.

**Toma de muestras.**

**Siembra de muestras y medios de cultivos.**

Se emplean dos frascos de hemocultivos. El primero contiene un medio de cultivo para aerobios y el segundo un medio para anaerobios.

El medio de cultivo para aerobios suele ser: Caldo tripticasa soja (TSB) y el de anaerobios el caldo de tioglicolato (THIOL).

Otros medios empleados en hemocultivos son:

- 1 – Caldo corazón-cerebro y caldo Columbia para aerobios.
- 2 – Caldo de Schaedler para anaerobios.
- 3 – Medio de Ruiz Castañeda para Brucellas.

Todos los frascos se presentan con presión reducida y atmósfera de CO<sub>2</sub>. La presión reducida facilita la toma de sangre efectuada con el dispositivo de extracción. La presencia de CO<sub>2</sub> favorece el cultivo de las bacterias en general y de los gérmenes microaerofilos en particular.

Los cultivos se incuban a 37°C durante dos semanas como mínimo y se examinan todos los días la 1ª semana, luego los días 14, 21 y 28 (en caso que no se detecte antes nada). Algunos gérmenes como Brucella, Corynebacterium y Propionibacterium, pueden no manifestarse hasta después de 2 ó 3 semanas de incubación.

El examen visual de los frascos permite observar un desarrollo microbiano. Este consistirá en la observación de la presencia de turbidez en el caldo, de una hemolisis (cambio de coloración) o por un depósito en la superficie de la capa leucocitaria sedimentada.

En los frascos aerobios la aparición de un color rojo-violáceo en el sedimento hemático puede interpretarse como crecimiento bacteriano.

En el momento que se aprecie crecimiento, hacer un examen en fresco, una tinción de Gram y resiembras en medios sólidos apropiados Agar Chocolate y Agar Sangre, así como un antibiograma.

### **Gérmenes más frecuentes hallados en hemocultivos:**

La sangre es un líquido estéril, por lo tanto cualquier microorganismo encontrado, Siempre que no sea de contaminación (piel etc...) está produciendo una patología.

- 1.- Estreptococo:
  - a.- Grupo A.- En todas las edades
  - b.- Alfa-hemolíticos.- En endocarditis
  - c.- Grupos A, B y D.- En recién nacidos
- 2.- Estafilococos aureus
- 3.- Neumococo (Estreptococo pneumoniae)
- 4.- Escherichia coli
- 5.- Salmonella typhi
- 6.- Bacteroides y otras bacterias anaerobias
- 7.- Pseudomonas aeruginosa
- 8.- Listeria monocytogenes
- 9.- Haemophilus influenzae
- 10.- Brucella melitensis (medio de Ruiz Castañeda)