

MANUAL DE ORIENTACION PARA ESTUDIOS EN DIARREAS

Sergio A. Lizano*

INTRODUCCION

Como estudiante de los primeros años de la carrera de Microbiología y Química Clínica y durante nuestro Trabajo Comunal Universitario al cual realizamos en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), sentimos la necesidad de información escrita básica que nos diera conocimientos fundamentales para ejecutar en mejor forma nuestra labor. Por eso, decidimos hacer consultas verbales y de literatura, para redactar este trabajo que tiene la finalidad de dar instrucción preliminar a aquellos estudiantes de Microbiología, que no han cursado las materias que comprende la Microbiología Médica y quienes colaboran en la realización de estudios de enfermedades diarreicas.

Las enfermedades diarreicas son una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en niños de los países en desarrollo (1). En Costa Rica, por ejemplo, la tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas en la década de 1920 era de 400, la cual declinó en 1980 a 5 por cada 100.000. Sin embargo, la diarrea todavía constituye una de las principales causas de morbilidad y es una causa relativamente frecuente de muerte en niños en Costa Rica (2).

En estudios sobre enfermedades diarreicas, es de primordial importancia establecer cuál es el agente, ya sea parásito, bacteria o virus que se asocia a la diarrea. Hace quince años en Costa Rica se identificaba el agente de las diarreas en apenas un 20% de los casos, pero actualmente con mejores conocimientos y medios para trabajar, la identificación se logra en un 70% de los pacientes que acuden a centros asistenciales (1). La importancia de saber cuál es el agente que produce la diarrea en algunos casos coadyuva en el tratamiento y además da oportunidad de tomar las medidas correctas para evitar que se disemine la infección.

El concepto de diarrea se amplía mucho si se toman en cuenta las diversas etiologías según los agentes infecciosos involucrados. La diarrea se conoce como una enfermedad infecciosa del intestino, que resulta en repetidas expulsiones de materia fecal en forma anormal. Si se registran más de tres

* Estudiante de III año, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

evacuaciones por día en un período inferior a quince días, la diarrea se define como aguda. La diarrea prolongada es aquella que se extiende por tres a cuatro semanas. La diarrea crónica tarda más de cuatro semanas, incluso hasta meses. A todo ello se añaden otros síntomas generalmente involucrados en la enfermedad diarreica, como los vómitos, deshidratación, fiebre y cuadros respiratorios (3).

La mayor parte de la materia fecal está constituida por bacterias. Normalmente, en el intestino delgado, hay lactobacilos, bacteroides y enterococos, y en el intestino grueso, bacteroides, fuso bacterias, *Escherichia coli*, enterococos, lactobacilos, *Klebsiella*, estreptococos, actinomicetos, difteroides, *Proteus*, levaduras, estafilococos, espiroquetas, virus y protozoarios (4).

Entre los microorganismos intestinales se encuentran algunos patógenos y son éstos los que se deben identificar, como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (enterotoxigénica y enteroinvasiva), *Yersinia enterocolytica*, entre otras. Además, pueden encontrarse virus como rotavirus, pararotavirus, adenovirus cultivables y no cultivables, enterovirus y coronavirus, entre otros. También se encuentran protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, etc. (3).

Para hacer un estudio de los agentes que producen diarrea debe conocerse lo siguiente:

- 1) Cómo hacer el estudio primario de las muestras fecales, a saber:
 - a- recolección
 - b- examen al microscopio
 - c- inoculación en medios de cultivo para aislamiento primario
- 2) Conocer pruebas de identificación de los agentes patógenos.

Obtención y manejo de la muestra fecal

A) Toma de la muestra

Para la toma de muestras fecales, se procede de varias formas. A veces sólo es necesario hacer un hisopado rectal, para lo cual se introduce un hisopo con punta de algodón en el esfínter rectal y se gira para obtener un poco de muestra (1). Sin embargo, para propósitos de un estudio en el cual se hacen una serie de análisis de identificación de agentes patógenos de enfermedades entéricas, es necesario obtener una considerable cantidad de muestra fecal utilizando métodos como los descritos a continuación.

1) Aspirado rectal

Cuando la consistencia de las heces es líquida se puede utilizar el aspirador rectal, el cual consiste de una jeringa y un tubo de hule delgado con un orificio en el extremo. Un gel lubricante se aplica a la parte del tubo que va a ser introducida en el ano para facilitar su entrada y así no maltratar al niño. Se debe tener cuidado de no aplicar el gel muy cerca

del orificio para evitar contaminación de las heces. La aplicación del gel es opcional debido a que puede tener propiedades bacteriostáticas que afectarían si las heces fueran contaminadas con el lubricante.

El niño se coloca boca arriba y sus piernas se sostienen arriba para facilitar la introducción del tubo. También el niño se puede colocar de cuclillas, aunque la primera forma es más usada. El tubo de hule se introduce lenta y cuidadosamente unos dos o tres centímetros en el ano y se prueba succionar suavemente con la jeringa. Si no se succiona muestra, se prueba introducir el tubo un poco más y se prueba la aspiración. Si aún no hay succión de la muestra, puede ser que el niño haya defecado recientemente o las heces son muy sólidas. En este último caso, se debe usar el método de torunda. Si la muestra fue obtenida por aspiración, se toman alrededor de dos mililitros y se pasan a un frasco de recolección limpio para su posterior envío al laboratorio.

2) Método de torunda

El uso de la torunda es un método relativamente más fácil que el anterior, y se utiliza principalmente cuando la consistencia de las heces es sólida o semisólida. Este consiste en introducir la punta con algodón de un aplicador 2-3 centímetros en el ano del niño y girarlo suavemente, induciendo al niño a pujar y así recoger la muestra en un frasco colocado debajo del ano, o bien se deja defecar en mantas limpias y se recoge con una paleta de madera. El niño se debe colocar y sostener de la forma descrita para el aspirado rectal. Es importante sostener al niño firmemente por las piernas para evitar movimientos bruscos que puedan quebrar la torunda cuando se introduce en el ano.

Los métodos anteriores se utilizan particularmente en niños que padecen diarrea u otras infecciones entéricas, con el fin de obtener muestras frescas para análisis. A veces es posible recoger la muestra fresca de niños que recién han defecado sobre una ropa o manta limpia. Es indispensable para todos los métodos de toma de muestras descritos usar guantes esterilizados y tener los cuidados necesarios para reducir al máximo las posibilidades de contaminación de la muestra de heces y del operador.

B) Transporte de la muestra

La muestra de heces aspirada o recogida con torunda es pasada de inmediato a un frasco limpio para su transporte. Es conveniente que no transcurran más de dos horas después de recoger la muestra para su posterior análisis, ya que de lo contrario no sobrevivirían microorganismos tales como *Shigella* y otros. Cuando se recogen hisopados rectales, se inoculan en medios de transporte que conserven los agentes patógenos de interés. Un ejemplo de tal medio es el caldo tetrionato en el que se inocula el hisopo.

Para el envío de muestras al centro o lugar de análisis, se procede a envolver cuidadosamente los medios de transporte de modo que no se dañen ni haya pérdida de muestra. Los medios deben estar rotulados debidamente según el código que se siga para la identificación de la muestra. Si varios materiales corresponden a una muestra común, como por ejemplo láminas de frotis y el frasco de transporte, éstos deben empacarse juntos para evitar confusiones.

C) Tratamiento primario de la muestra de heces

El estudiante de Microbiología que está empezando a trabajar con aspectos básicos sobre los análisis concernientes a enfermedades causadas por agentes patógenos, particularmente el caso de enfermedades diarreicas que nos ocupa, debe familiarizarse con las principales técnicas de preparación de muestra para análisis. Tales técnicas comprenden la preparación de frotis e inoculación o "siembra" en medios de enriquecimiento y cultivo, principalmente. También debe adquirir conocimientos básicos acerca de la composición y preparación de estos medios de cultivo.

1) Preparación de frotis

Se usan dos láminas de vidrio corriente para trabajo con microscopio. Estas miden 3x1 pulgadas. Se debe rotular en uno de los extremos y en el resto de las láminas se hacen dos frotis extendiendo la materia fecal con la paleta de madera o con un aplicador, de forma que quede una capa muy fina a todo lo largo y ancho de la lámina. Los dos frotis se dejan secar al aire y se fijan en metanol introduciéndolos en un frasco Coplin por un lapso de tres minutos. Luego se sacan y se dejan secar. Se envuelven en un trozo de gaza de 15x10 cm. aproximadamente, colocándolos de manera que no se peguen entre sí y con cinta adhesiva se unen al frasco correspondiente, que contiene la muestra de heces. Esas dos láminas son posteriormente teñidas con coloraciones especiales para la observación de microorganismos al microscopio.

2) Inoculación en medios de enriquecimiento

Para los estudios de aislamiento y clasificación de bacterias, el aplicador con la muestra se introduce en un medio de enriquecimiento como el caldo tetratonato. Este medio está constituido por substancias que permiten la proliferación de las bacterias que interesa estudiar e inhibe el crecimiento de las otras. Se usa especialmente para el aislamiento de bacterias como *Salmonella*. A cinco mililitros de ese caldo debe agregarse dos gotas de una solución de yodo, la cual actúa inhibiendo el crecimiento de ciertos microorganismos. El tubo rotulado debe taparse con un tapón de hule o algodón y unirse a los frotis y al frasco que contiene la muestra.

3) Inoculación en medios de cultivo

Los medios de cultivo que inocula el estudiante en este proyecto son: agar *Salmonella-Shigella* (SS), MacConkey (Mc), Butzler (Bz). Estos medios de cultivo son sólidos y se usan en platos de Petri. Para hacer la inoculación se esteriliza una aza bacteriológica a la llama, colocándola con una inclinación de 20 grados, se enfría y se pone muy suavemente, se extiende la muestra con movimiento de zig-zag de un extremo a otro del plato hasta la mitad de este. También se puede trazar una línea con el aza desde el punto donde se aplicó la muestra hasta la mitad del plato, y después se raya en zig-zag desde el punto de aplicación. En las Figuras 1 y 2 se muestran estas dos formas de inocular en la mitad del plato. De éstas la más recomendable es la Figura 1. Algunas veces la inoculación se hace en un plato entero, haciendo las figuras en zig-zag en los cuatro cuartos del plato, como se ilustra en la Figura 3. Esta inoculación se hace así con el fin de que queden áreas con muy poca muestra y por lo tanto con crecimiento de colonias aisladas que permitan su mejor observación y clasificación. Al realizar los movimientos zig-zag, el aza debe mantener un suave contacto con el agar y no removerse en ningún momento durante el rayado. Además, el rayado no se debe devolver a un punto ya inoculado. En el caso de una inoculación en medio plato, la aplicación del aza no debe tocar la otra mitad donde otra muestra puede ser o está inoculada para evitar contaminación.

La manipulación del plato de agar se puede hacer con una sola mano, ya que la otra utiliza el aza para inocular. Con una mano se coge el plato de Petri, sosteniendo la placa de agar con los dedos meñique, anular y medio. La tapa se abre al inocular, manipulando con el dedo pulgar y prensando con el dedo medio un extremo.

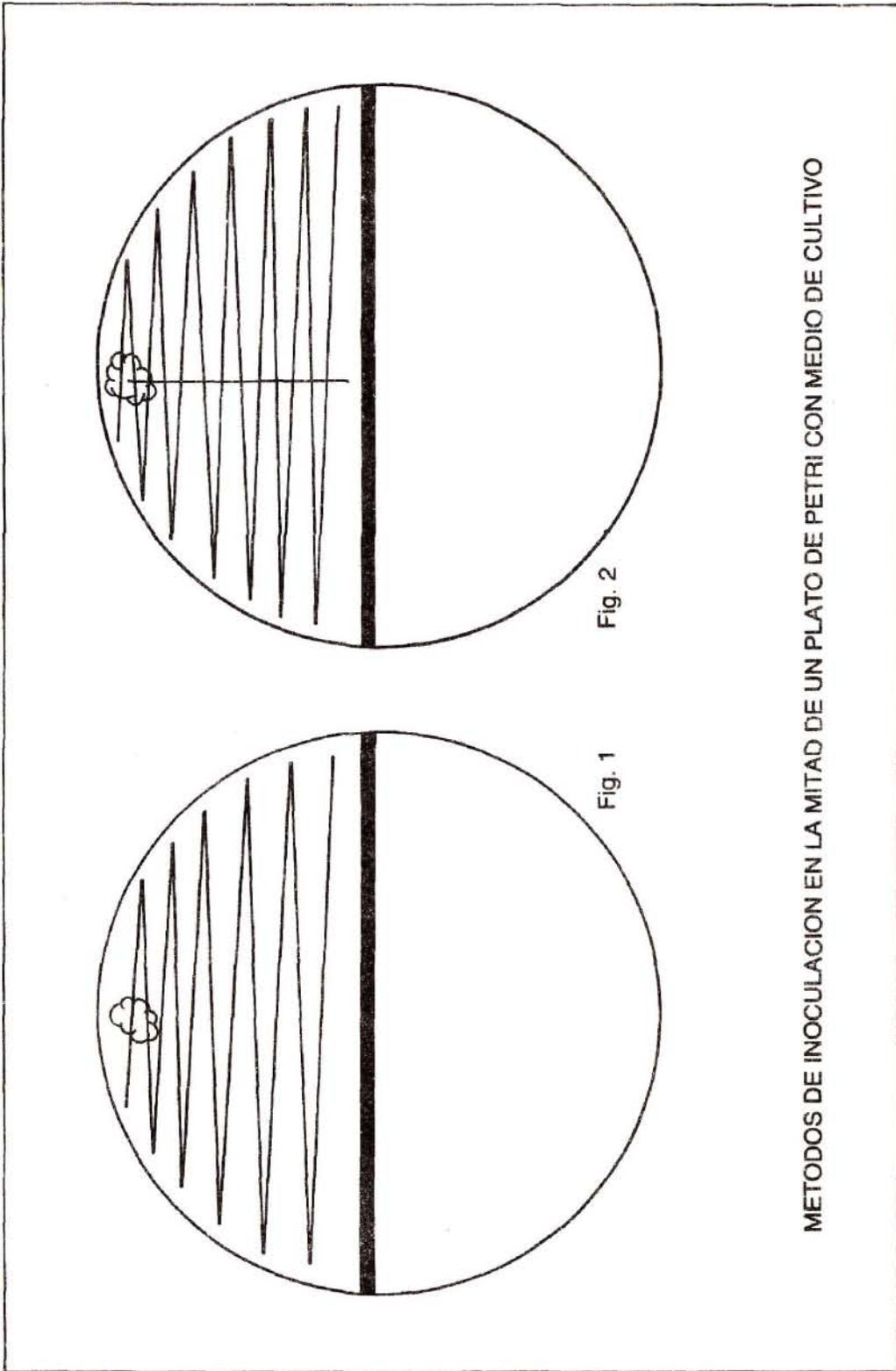
Una vez inoculado el medio se debe poner bajo las condiciones necesarias para el desarrollo de las colonias aisladas (por ejemplo, incubación a determinadas temperatura y tiempo, reducción de oxígeno del medio, etc).

Medios de cultivo

Para el estudio bacteriológico de las diarreas, se usan muy variados medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos. Unos medios se usan en el aislamiento primario y otros en su clasificación. Como dijimos antes, en este proyecto se usa un medio líquido de enriquecimiento, el caldo tetrionato y medios sólidos que son el SS, Mc, Bz.

El caldo tetrionato se usa en tubos que contienen 5 ml del medio que está constituido por proteosa, peptona, sales biliares, carbonato de calcio y tiosulfato de sodio (5).

El agar SS tiene extracto de carne y proteosa-peptona como fuente de proteínas, como azúcar tiene lactosa y además sustancias que inhiben el



METODOS DE INOCULACION EN LA MITAD DE UN PLATO DE PETRI CON MEDIO DE CULTIVO



crecimiento de bacterias que no sean *Shigella* y *Salmonella*. Entre estas sustancias inhibitoras, el medio contiene sales biliares, sulfato de sodio, verde brillante; para controlar el pH tiene rojo neutro y para hacerlo sólido tiene agar. En este medio, *Salmonella*, *Shigella* y otras bacterias que no fermentan la lactosa, producen colonias transparentes, incoloras y generalmente lisas. Algunas pocas bacterias que sí fermentan la lactosa pueden crecer en este medio con colonias de color rojo.

El agar Mc se usa también para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Como proteínas tiene peptona y proteosa-peptona. Como azúcar tiene lactosa; como inhibidor de crecimiento de otras bacterias tiene sales biliares y cristal violeta. Igual que el SS, tiene como indicador el rojo neutro y se endurece con agar. En este medio las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son también incoloras y transparentes. Las bacterias que fermentan la lactosa tienen color rojo o rosado (6).

El medio de Butzler (Bz) es el que más recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) para aislar *Campylobacter*. Este medio tiene tioglicolato, sangre de carnero o humana, extracto de levadura y se endurece con agar. Además tiene antibióticos como bacitracina, novobiocina, colicistina, cefoxitina y un inhibidor de hongos que es actidiona.

Este medio no se incubaba a 37°C como los otros sino a 42°C, que es la temperatura a la cual crece mejor *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*. Además, la incubación se hace en un medio microaerófilico que tiene sólo 5-10% de oxígeno y 90-95% de una mezcla de nitrógeno y dióxido de carbono. En este medio las colonias son pequeñas, brillantes, planas y de color grisáceo (7).

AGRADECIMIENTO

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento al Dr. Leonardo Mata, Dra. Rosario Achí, Dra. Cecilia Lizano y Dr. Jaime Guevara, por los consejos y material que me proporcionaron para hacer este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Manual de Investigaciones de Laboratorio de Infecciones Entéricas Agudas. OPS/OMS. 128 pp. 1983.
2. Mata, L., Simhon, A., Padilla, R., Gamboa, M., Vargas, G., Hernández, F., Mohs, E. & Lizano, C. Diarrhea Associated with Rotaviruses, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and other Agents in Costa Rican Children. 1976-1981. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 32:142, 1983.
3. Mata, L., Urrutia, J. y Simhon, A. Infections Agents in Acute and Chronic Diarrhea of Childhood. Chronic Diarrhea in Children pp. 237-251. Ed. Emanuel Leventhal. Nestlé, Vevey/Raven Press, New York, 1984.
4. Gardner, P. & Provine, H. Manual of Acute Bacterial Infections: Early Diagnosis and Treatment. 1st ed., Little, Brown & Co. Boston, Mas. 1976.
5. Difco Manual. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. 350 pp. 9th Ed. Difco Labs. Detroit, Mich. 1974.
6. Manual BBL. Procedimientos de Laboratorio y de Productos Baltimore Biological Laboratories. 213 pp. 5ta. Ed. 1974.
7. Hernández, F. et. al.: Aislamiento y Diagnóstico de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. Rev. Med. Hosp. Nal. Niños. Costa Rica 18:1, 1983.