

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS RELACIONADAS CON ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Autor Dr. Fidel Espinosa Rivero

Departamento Microbiología

CONTENIDO

- Exudado vaginal simple
- Exudado vaginal con cultivo
- Exudado endocervical
- Exudado uretral
- Espermocultivo

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Incubadora de CO₂ o frasco con vela.
- Mechero de gas.
- Microscopio óptico.
- Centrifuga.

Materiales

- Asas
- Láminas porta y cubreobjeto
- Papel de filtro
- Tubos de 13 x 100
- Tubos de 12 x 125
- Placas de Petri
- Pipetas

Reactivos

- Reactivos de coloración de Gram
- Aceite de inmersión
- Reactivo de oxidasa

- Reactivo de catalasa.
- Hidróxido de potasio

Medios de cultivo:

- Agar chocolate
- Sabouraud cloramfenicol dextrosa agar

TÉCNICA DE EXUDADO VAGINAL SIMPLE

Objetivo

- Para determinar la presencia de células levaduriformes, *Trichomonas vaginalis* y *Gardnerella vaginalis*.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- Toma de la muestra del exudado vaginal, que se realizará con los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras y se introducirá el hisopo en un tubo conteniendo 1 mL de solución salina.

Procedimiento

- Una vez llegada la muestra al laboratorio, se centrifugan los tubos a 2 500 rpm durante 5 minutos y con pipeta Pasteur se toma una gota del sedimento y se observa al microscopio entre cubre y portaobjetos, primeramente con lente de 10X y luego con lente de 40X.

Cálculo e interpretación de los resultados

- En caso de observarse células levaduriformes gemantes abundantes, con presencia o no de filamentos, se informará la prueba como **positiva** de células levaduriformes. Este resultado sólo se informará al paciente en el caso en que su observación se haya efectuado recién traída la muestra al laboratorio y no después de su incubación.
- En caso observarse *Trichomonas vaginalis*, se informará su presencia, tanto si se constató en la primera observación como en las siguientes.
- Para el diagnóstico en particular de *Gardnerella vaginalis* se siguen los siguientes procedimientos:

- ⊕ Toma del pH.
- ⊕ Prueba del KOH.
- ⊕ Coloración de Gram.
- ⊕ Cultivo en agar vaginalis e identificación bioquímica.

Toma del pH

- Se realiza empleando papel indicador, aplicándolo sobre una lámina portaobjeto donde previamente se haya colocado la secreción vaginal de la paciente. El pH normal oscila entre 4 y 4,5, y generalmente se encuentra elevado a 5 - 5,5 en las infecciones por *Gardnerella vaginalis*.

Prueba del KOH

- Se realiza colocando una gota de la secreción vaginal sobre una lámina portaobjetos y agregándole una gota de KOH 10 %. En las infecciones por este germen hay presencia de aminas aromáticas: putrescina y cadaverina que se liberan durante la reacción desprendiendo un olor a "pescado putrefacto". En estos casos se considera positiva la prueba y negativa cuando no se percibe ese olor.

Coloración de Gram

- Se realiza una extensión fina de la secreción vaginal sobre una lámina portaobjetos, a la cual se le realiza coloración de Gram, según las normas establecidas, después de lo cual se realiza observación microscópica con lente de inmersión, buscando:
 - ⊕ Células "guías" o "indicadoras", que se observan como grandes células epiteliales descamadas de la superficie vaginal a las cuales se adhieren gran cantidad de bacilos cortos Gram negativos. Constituye un importante indicador la ausencia de leucocitos en la secreción vaginal, que puede precisarse tanto en la coloración de Gram como en la observación directa al microscopio del exudado vaginal.

Nota: El diagnóstico de Gardnerella vaginalis quedará establecido teniendo en cuenta los criterios anteriormente expuestos de pH mayor de 4.5, KOH positivo, presencia de células guía en la observación microscópica y ausencia de leucocitos.

Cultivo en agar vaginalis

- Las muestras se inoculan directamente en las placas conteniendo este agar (ver libro de medios de cultivo); se estrian con asa de *nycrón* y se incuban durante 72 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 10 % de CO₂.

Se realizan lecturas diarias, buscando colonias pequeñas (0,5 mm) grisáceas, de borde entero, superficie lisa y brillante, rodeadas de un halo pequeño de hemólisis Beta, con bordes poco definidos, diferente a la observada en los estreptococos hemolíticos. Se realiza coloración de Gram, prueba de

catalasa, que debe ser negativa y se procede al reaislamiento e identificación.

Pruebas bioquímicas

- Hidrólisis del almidón.
- Hidrólisis del hipurato.
- Utilización de glucosa, maltosa y rafinosa.

Esta prueba confirmará el diagnóstico si resultan positivos el almidón y el hipurato, mientras que la rafinosa es negativa.

TÉCNICA DE EXUDADO VAGINAL CON CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Objetivo

- Determinar la presencia mediante cultivo de bacilos Gram negativos, estafilococo coagulasa positiva y especies de Estreptococo.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- Toma de la muestra del exudado vaginal, que se realizará con los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras.

Procedimiento

- Una vez llegadas al laboratorio las placas inoculadas con la secreción vaginal, se estiarán y se incubarán a 37°C con 10 % de CO₂, realizándose lecturas diarias, hasta las 48 horas.

Cálculo e interpretación de los resultados

- En el caso en que a las 48 horas de incubación no se constate crecimiento se informará: no se obtuvo crecimiento de gérmenes patógenos.
- En el caso en que a las 24 o 48 horas de incubación se constate la presencia de crecimiento, se procederá a realizar reaislamiento e identificación del germen en cuestión y se informará el resultado conteniendo el nombre del microorganismo y el antibiograma. En el caso en que se aísle *Neisseria gonorrhoeae*, en lugar de antibiograma se realizará la prueba de la beta-lactamasa.

TÉCNICA DE EXUDADO VAGINAL CON CULTIVO MICOLÓGICO

Objetivo

- Determinar la presencia mediante cultivo de especies de Candida
- **Alcance**
- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- Toma de la muestra del exudado vaginal, que se realizará con los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras inoculándose las secreciones vaginales en medio de Sabouraud cloramfenicol dextrosa agar

Procedimiento

- Una vez llegadas al laboratorio las placas inoculadas con la secreción vaginal, se incubarán a 37°C realizándose lecturas diarias, hasta 7 días.

Cálculo e interpretación de los resultados

- En el caso en que al realizar la lectura se constate la presencia de 10 o más colonias de levaduras se procederá a su aislamiento e identificación según se indica en el acápite de Micología informando el germen implicado.
- En el caso en que se constate el crecimiento de 10 o menos colonia, o no se constate crecimiento el examen se informa como flora normal

Técnica de exudado endo cervical

Objetivo

- Para determinar la presencia de Neisseria gonorrhoeae en secreciones endocervicales, así como la presencia de bacilos Gram negativos, estafilococo coagulasa positiva y especies de estreptococo.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse al manual de seguridad y bioseguridad del departamento.

Operaciones preliminares

- Remitirse al manual de toma de muestras de exudados endocervicales.

Procedimiento

- En el caso de este examen al laboratorio debe llegar una muestra de secreción endocervical extendida sobre una lámina portaobjeto para coloración de Gram y otra inoculada en medio de agar Thayer Martin o agar chocolate, siguiendo los procedimientos de toma, transporte y conservación adecuadas de las muestras.
- La lámina una vez fijada y coloreada con la tinción de Gram se observará al microscopio con lente objetiva de 100 x. Las placas inoculadas con las secreciones endocervicales se estriarán y se incubarán a 37°C durante 48 horas con una atmósfera de 10 % de CO₂.
- Se efectuarán lecturas diarias esperando la aparición de colonias sospechosas a las cuales se les realizará coloración de Gram, en busca de diplococos Gram negativos arriñonados, prueba de oxidasa la cual será positiva en caso de tratarse de una Neisseria y además se efectuará la prueba de fermentación de carbohidratos (glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa), resultando positiva a la glucosa y negativos los restantes azúcares.

Una vez obtenido el diagnóstico de Neisseria gonorrhoeae, se procederá a realizar la prueba de la beta-lactamasa que se referirá más adelante. Se realizarán otras pruebas que corroboren el diagnóstico y faciliten el mismo. Se incluirían exámenes de Biología molecular, hibridación y amplificación del ADN, así como pruebas de coaglutinación, inmunofluorescencia u otras pruebas de diagnóstico rápido disponibles en el laboratorio.

En caso de obtener otro tipo de colonias sugestivas de la presencia de algún otro germen patógeno se procederá a su reisolamiento e identificación según las normas del laboratorio.

Cálculo e interpretación de los resultados

- La observación al microscopio de diplococos arriñonados Gram negativos, intra y extracelulares, con abundantes leucocitos polimorfonucleares, resultará un diagnóstico presuntivo de Neisseria gonorrhoeae, que deberá confirmarse con el cultivo y las técnicas de identificación, además se notificará como productor o no de beta-lactamasa.

Prueba de la beta-lactamasa. Método yodométrico

- Preparación de soluciones:

Solución de almidón 1 %

- ⊕ A 1 g de almidón soluble se añaden 100 mL de agua destilada calentando hasta lograr una disolución completa del almidón.

Solución de penicilina 1 %

- ⊕ Se disuelve 1 g de penicilina G potásica en 100 mL de agua destilada.
Se unen ambas soluciones en un beaker y se introducen en los mismos tiras de papel de filtro de 1 x 3 cm y se mantienen tapadas a 4°C y en condiciones de asepsia durante 24 horas. Dichas tiras son colocadas luego en un horno seco abierto durante 10 minutos y una vez secas se guardan en frasco estéril a -20°C para impedir la inactivación del antibiótico.

⊕ **Procedimiento**

- ⊕ Con una pinza se toma una tira ya preparada y se coloca en una placa Petri estéril, humedeciéndose con una gota de lugol, el cual va a actuar como velador tomando la tira un color azul intenso. Con un asa de platino se toma una porción del cultivo y se frota en la tira y se deja 15 minutos.

⊕ **Interpretación**

- ⊕ **Positiva:** se produce una decoloración de la zona de inoculación, lo que indica que la cepa es productora de beta-lactamesa.
- ⊕ **Negativa:** no variación del color.

TÉCNICA DE EXUDADO URETRAL

Objetivo

- Se realiza con finalidad de determinar presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, así como de otros agentes productores de uretritis inespecíficas.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse al manual de seguridad y bioseguridad del departamento.

Operaciones preliminares

- Se realiza la toma de muestras de exudado uretral, con todos los requerimientos, según el manual de toma de muestras.

Procedimiento

- Se realizará examen directo de la secreción uretral, mediante coloración de Gram, según las normas, observándose con lente de inmersión, en busca de diplococos Gram negativos, arriñonados intra y extracelulares.
- Se realizará inoculación de la secreción uretral en una placa de agar Thayer Martín o agar chocolate y se incubará durante 48 horas a 37°C.

Se realizan lecturas diarias y se realizará aislamiento e identificación del germen de que se trate.

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se informará el nombre del germen patógeno que se trate, con el resultado del antibiograma, excepto caso de haberse aislado *Neisseria gonorrhoeae*, donde se procederá a realizarle a la cepa la prueba de beta-lactamasa

TÉCNICA DEL ESPERMOCULTIVO

Objetivo

- Aislamiento e identificación de gérmenes patógenos que se encuentren en el líquido seminal.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con los requisitos señalados y que soliciten esa prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse al manual de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- La muestra será tomada por el paciente en frasco estéril y trasladada de inmediato al laboratorio.

Procedimiento

- En primer lugar se realizará examen directo del semen entre cubre y portaobjeto con la finalidad de observar la presencia de *Trichomonas vaginalis* y/o células levaduriformes.
- Para el cultivo la muestra se inoculará en agar chocolate y se incubará durante 48 horas a 37°C, realizándose lecturas diarias. En caso de observarse crecimiento, se trabajará el germen en cuestión hasta llegar a su total aislamiento e identificación, según corresponda.

Análisis e interpretación de los resultados

Se considerará como patógeno cualquier germen aislado de esta muestra y se informará su nombre con el antibiograma de la cepa.