

GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE ENFERMEDAD DIARRÉICA AGUDA (EDA) Y ENFERMEDAD TRANSMITIDA POR ALIMENTOS (ETA) DE ORIGEN BACTERIANO

DIRECCIÓN DE REDES EN SALUD PÚBLICA
SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE MICROBIOLOGÍA

2017



GOBIERNO DE COLOMBIA



Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Esther Cristina Barros Linan
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

María Alexandra Durán Romero
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Coordinador del Grupo de Microbiología
Carolina Duarte Valderrama
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Profesionales
Equipo Técnico
Sandra Milena Barrera Ayala
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Lucy Angeline Montaña Valencia
Profesional del Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública



Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| OBJETIVOS DE LA GUÍA | 4 |
| ALCANCE..... | 4 |
| DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS | 5 |
| 1. GENERALIDADES | 7 |
| 1.1 Agente infeccioso | 8 |
| 1.2 Modo de transmisión | 8 |
| 1.3 Prevención..... | 9 |
| 2 DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO..... | 10 |
| 2.1 Bioseguridad..... | 10 |
| 2.2 Toma de muestras..... | 11 |
| 2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:..... | 11 |
| 2.4 Documentación requerida | 12 |
| 2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico..... | 13 |
| 3 CONTROL DE CALIDAD..... | 18 |
| 4 VIGILANCIA DE LOS AGENTES INFECCIOSOS | 18 |
| 5 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO..... | 19 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 20 |



OBJETIVOS DE LA GUÍA

- Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio para la vigilancia por laboratorio de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) y Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) de origen bacteriano.
- Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección de EDA – ETA bacteriana.
- Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio de EDA – ETA bacteriana.
- Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo.
- Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio de EDA – ETA bacteriana, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio de EDA – ETA en materia fecal y métodos con los cuales se detectan en el laboratorio nacional de referencia del INS.



DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

DEFINICIONES

Antígeno Bacteriano: molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo (Ac), por células presentadoras de antígenos (Ag) y que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune. (1)

Coprocultivo: método de diagnóstico microbiológico que permite identificar los agentes bacterianos causantes de enfermedad gastrointestinal, mediante la siembra de un medio de cultivo selectivo de materia fecal. (2)

Deshidratación: pérdida durante un episodio de diarrea de agua y electrolitos (sodio, cloruro, potasio y bicarbonato) en las heces líquidas, los vómitos, el sudor, la orina y la respiración. (1)

Diarrea: Se define como la deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. (1)

Medios de cultivo: cualquier preparación líquida o sólida hecha específicamente para cultivo, almacenamiento o transporte de microorganismos u otros tipos de células. La variedad de los medios que existen permiten el cultivo de microorganismos y tipos de células específicos, como medios diferenciales, medios selectivos, medios de test y medios definidos. (3)

Medio de transporte: medio de cultivo que es capaz de mantener viva una muestra o cepa de microorganismos por un periodo prolongado, manteniendo a los microorganismos vivos y sobre todo sin alterar su concentración. (3).

Prevalencia: se refiere a todos los casos tanto nuevos como viejos, al paso que, incidencia se refiere solo a nuevos casos. La prevalencia puede referirse a un momento dado (prevalencia momentánea), o a un período determinado (prevalencia durante cierto período)

Morbilidad: proporción de pacientes con una enfermedad particular durante un año fijado por una determinada unidad de población

Mortalidad: concepto estadístico para determinar muertes causadas u ocurridas en un evento específico con enfermedades.

Pruebas bioquímicas: medios de cultivos líquidos o sólidos que contienen sustancias especiales de enriquecimiento, suplemento, que al ser inoculados permiten la diferenciación de la bacteria. (3)

Serogrupo: lipopolisacarido -antígeno somático O-, es una subpoblación de un microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones de la misma especie por medio de pruebas serológicas.

Serotipo: o serovar es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular.

Serotipificación: proceso de reacción antígeno - anticuerpo que pone en evidencia la presencia de antígenos ya sean somáticos o flagelares.

Vigilancia epidemiológica: conjunto de actividades que permite reunir la información indispensable para conocer la conducta o la historia natural de las enfermedades, así como detectar o prever alteraciones de sus factores condicionantes, con el fin de recomendar las medidas indicadas y eficientes que conduzcan a la prevención y al control de determinados agravios

SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

DVCSP: Dirección Vigilancia y análisis del riesgo en Salud Pública
EDA: Enfermedad Diarreica Aguda
ETA: Enfermedad Transmitida por Alimentos
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Sivigila: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
INS: Instituto Nacional de Salud.
LNR: Laboratorio Nacional de Referencia
LSP: Laboratorio de Salud pública
LSPD: Laboratorio de Salud Pública Departamental o Distrital
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPS: Organización Panamericana de la Salud
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa



1. GENERALIDADES

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, especialmente en los países en vía de desarrollo, debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad que se presentan en la población infantil, especialmente en niños menores de cinco años. Por lo general, estas patologías son causadas por la ingesta de agua y alimentos contaminados. (4)

La OMS reconoce que las ETA son importantes y requieren el establecimiento de esquemas de vigilancia epidemiológica para determinar el número de casos y sus causas (7). La incidencia mundial de ETA es difícil de estimar, pero se reporta que en el 2005 alrededor de 1,8 millones de personas murieron a causa de enfermedades diarreicas. Una gran proporción de estos casos puede atribuirse a la contaminación de alimentos y del agua potable o a la desnutrición en lactantes e infantes, consecuencia de la deshidratación asociada a episodios diarreicos.

Latinoamérica experimentó al menos 6.000 brotes de diversos tipos de enfermedades de origen alimentario entre 1993 y 2002 según las cifras ofrecidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la OMS. Estos brotes, junto a un número mayor de casos aislados de enfermedades provocadas por la ingesta de alimentos y agua, causaron en la región alrededor de 57.000 muertes en 2004. Sin embargo, esta estimación se encuentra todavía muy por debajo de la incidencia real del problema según los expertos (8).

En Colombia, el Grupo de Microbiología del INS con apoyo de la Organización Panamericana de la salud (OPS) a través de la Red Nacional de Laboratorios inició en 1997 el programa de vigilancia de EDA bacteriana, que incluye la caracterización de los principales agentes causales: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., y *L. monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 y *Campylobacter* spp., de ingreso reciente al programa. Por medio de esta vigilancia se ha establecido un panorama global sobre el comportamiento epidemiológico de estos patógenos en Colombia, lo que ha contribuido a la caracterización por laboratorio de brotes de ETA. (8,9).

A nivel nacional, las ETA son unas de las causas más comunes de gastroenteritis de origen alimentario en humanos, que pueden traer consigo graves secuelas para la salud de las personas infectadas y que circulan en diferentes regiones del país. (Para información sobre *Vibrio cholerae*, remitirse a la Guía para la Vigilancia por laboratorio de cólera)



1.1 Agente infeccioso

Las ETA se manifiesta de forma súbita, generalmente caracterizado por síntomas como vómito, diarrea, fiebre, dolor abdominal, cefalea, algunas veces reacciones alérgicas, deshidratación y otras que comprometen el sistema nervioso central e incluso causan la muerte, después del consumo de alimentos o agua contaminada. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad (21). Teniendo en cuenta los principales agentes causales de EDA-ETA de la vigilancia por laboratorio, se amplía información de acuerdo a un microorganismo específico ver tabla 1. Características de patogenidad de Enteropatógenos.

1.2 Modo de transmisión

Ver tabla 1. Características de patogenidad de Enteropatógenos

Tabla 1. Características de patogenidad de Enteropatógenos



| Agente bacteriano | Transmisión | Reservorio | Periodo de incubación | Patogénesis |
|-------------------------------|--|---|---|---|
| <i>Salmonella</i> spp. | Vía de ingreso oral, por ingestión de agua o alimentos de origen animales contaminados o por contacto con personas infectadas ⁹ . | Animales domésticos, salvajes y de producción. Portadores crónicos ^{9,10} . | De 6 a 72 horas con un promedio de 12 a 36 horas ^{9,10} . | Resistente las condiciones del tracto gastrointestinal, coloniza el intestino delgado e invade los ganglios linfáticos, provocando una infección localizada. Evade las defensas intracelulares y se disemina al torrente sanguíneo produciendo una infección sistémica. Se elimina por las heces, quedando libre en el ambiente ¹² . |
| <i>Shigella</i> spp. | Vía de ingreso oral, por ingestión de agua o alimentos de origen animales contaminados (sobrevive hasta 30 días en alimentos ¹⁰) o por contacto con personas infectadas ⁹ . | El ser humano es el único reservorio conocido de este agente ⁹ . | El periodo de incubación varía de 1 a 7 días pero típicamente es de 2 a 4 días ⁹ . | La invasividad es el factor de virulencia más importante para causar la enfermedad. <i>Shigella</i> spp. es tolerantes a pH bajos, por lo que pueden soportar la acidez del estómago y luego colonizar el tracto digestivo ¹³ . Típicamente se presenta una inflamación aguda con úlcera del epitelio ¹⁴ . La diseminación al torrente sanguíneo no es común. La infección está asociada a higiene deficiente y a la baja dosis infectante (100 a 200 bacterias). |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | La transmisión puede ser vertical (madre-hijo), por contacto con animales enfermos y como una infección asociadas a la atención en salud ¹⁰ . | Animales domésticos, salvajes y de producción, se encuentra en distribuido en ambientes Naturales. Portadores crónicos ^{9,10} . | El periodo de incubación puede ser de 2 semanas a 3 meses ⁹ . | Este patógeno intracelular invade los macrófagos y la mayoría de los tejidos celulares en los que puede proliferar. Posterior a la internalización, la bacteria ingresa al citoplasma celular y se catapulta entre las células, infecta las placas de Peyer invadiendo los nódulos linfáticos y el torrente sanguíneo. El órgano blanco principal es el hígado. Puede ocasionar septicemia, meningitis y abortos espontáneos. |
| <i>Campylobacter</i> spp. | Vía de ingreso oral, por ingestión de agua o alimentos de origen animales contaminados o por contacto con personas infectadas ⁹ . | Animales domésticos, y de producción. Portadores crónicos ^{9,10} . | El periodo de incubación es de 2 a 5 días, con límite de 1 a 10 días ⁹ . | Por un mecanismo similar a <i>Salmonella</i> no Typhi, <i>Campylobacter</i> spp. invade células del intestino delgado, las lesiona y altera la absorción de líquidos ocasionando diarrea severa. Es considera el agente etiológico de otros síndromes como Guillan-Barré. |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | Vía de ingreso oral, por ingestión de agua o alimentos de origen animales contaminados o por contacto con personas infectadas ⁹ . | Animales domésticos, y de producción, especialmente ganado bovino ¹⁷ . Puede encontrarse en vegetales por contaminación cruzada. | Tiene un periodo de incubación de 3 a 4 días ¹⁸ . | Adherencia íntima a los enterocitos intestinales, en donde se realiza una transducción de señales ocasionando una alteración del cito esqueleto, posteriormente se secretan las shigatoxinas stx1, y stx2 ¹⁷ produciendo el síndrome hemolítico urémico (SHU). |

1.3 Prevención

Las EDA - ETA son causadas en la mayoría de los casos por el consumo de alimentos en mal estado, o por la incorrecta manipulación de los mismos en las diferentes etapas, desde el procesamiento hasta su consumo; son considerados los de mayor riesgo en salud pública: lácteos, huevos, carnes, entre otros, es por ello que debemos realizar acciones que garanticen el cumplimiento de las normas básicas de higiene, dado que podría afectar directamente a los niños, niñas y adolescentes, ocasionando serias consecuencias para su salud.

Sin embargo, las actuales intervenciones de capacitación y capacitación de los trabajadores demuestran un modesto éxito en el cambio del comportamiento de los trabajadores de los servicios alimentarios

La Organización Panamericana de la Salud recomienda aplicar cinco medidas claves:

- mantener la higiene,
- separar los alimentos crudos de los cocidos,
- cocer totalmente los alimentos,
- mantener los alimentos a temperaturas seguras, y
- utilizar agua e ingredientes crudos seguros.

2 DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

El laboratorio tiene una importante función en la identificación de los agentes etiológicos de los casos de ETA y está a cargo del Laboratorio de Salud Pública de cada departamento.

Es importante tener en cuenta que en la atención clínica de un caso y/o brote es determinado de acuerdo a la sintomatología dada por el médico tratante, y el posible diagnóstico de ETA debe ser relacionado a un posible origen infeccioso o no infeccioso, por lo tanto los exámenes respectivos se deberán realizar en la IPS donde se atendió el caso.

La información generada a partir de los análisis de laboratorio, permitirá luego hacer el análisis epidemiológico de los agentes etiológicos identificados y así mismo, orientar las acciones de prevención de las ETA relacionadas principalmente con las acciones de IVC tanto del INVIMA como de las áreas de salud ambiental de las secretarías de salud.

Teniendo en cuenta lo anterior, las acciones que se deben realizar dentro de la vigilancia por laboratorio del evento, por parte de los laboratorios que pertenecen a la Red Nacional de Laboratorios se explican en la tabla No. 2

Tabla 2. Responsabilidad de los laboratorios frente al evento en cada uno de los niveles

| IPS Primer nivel | IPS segundo nivel | IPS Tercer nivel | LSP | INS |
|--|--|---|--|--|
| Toma y envío de muestras al siguiente nivel | Coprocultivo e identificación bacteriana | Coprocultivo e identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad antimicrobiana | Confirmación a nivel de género, especie, pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los agentes bacterianos | Confirmación, serotipificación, pruebas de sensibilidad antimicrobiana, pruebas moleculares para establecer clonalidad de los aislamientos, caracterización de brotes y control de calidad |

Nota: tener en cuenta el reenvío al siguiente nivel si no se cuenta con capacidad diagnóstica.

2.1 Bioseguridad (5)

- El personal de laboratorio debe recibir adiestramiento específico en cuanto al manejo de los agentes patógenos y estar dirigido por profesionales competentes.
- El acceso al laboratorio tiene que ser limitado en horas de trabajo.

- El personal que realiza ciertos procedimientos que requieren la creación de aerosoles infecciosos o salpicaduras tiene que utilizar los elementos de protección personal correspondientes.

2.2 Toma de muestras (6)

Los laboratorios deben enviar todos los aislamientos bacterianos obtenidos de casos de ETA dentro del sistema de referencia y contra-referencia del LNR, para su confirmación.

Las muestras utilizadas para el diagnóstico de ETA son:

- Muestras biológicas (materia fecal)
- Ambientales (ver Guía de para la toma de muestras de agua para análisis microbiológico)
- Muestras de alimentos (competencia del INVIMA).

Nota: muestras de vomito no se procesan, no hay protocolos normalizados y estandarizados para su procesamiento.

Muestras adecuadas

- No contaminada con orina
- Fresca: menor a 2 horas después de su evacuación.
- Recolectada por frotis rectal, no se recomienda de rutina.
- Contenido duodenal, de colostomía o ileostomía.

Muestras inadecuadas

- Que no ha sido preservada en un medio de transporte adecuado y que tiene más de 2 horas de haber sido recolectada.
- Hisopos secos con muestras de frotis rectal

2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:

Los laboratorios deben enviar todos los aislamientos bacterianos que fueron obtenidos de casos de EDA o ETA dentro del sistema de referencia y contra-referencia del LNR, para su confirmación.

Tipo de muestra

Las muestras para el diagnóstico de cólera son:

- Biológicas: materia fecal o hisopado rectal
- Ambientales: agua

Recolección de la muestra

- La muestra de materia fecal debe ser recolectada en un recipiente limpio, libre de preservativos y detergentes, seco, de boca ancha con tapa. No es necesario que sea estéril.
- En algunos casos el frotis rectal es más eficaz que las heces, particularmente en los pacientes adultos severamente debilitados.
- Con relación al volumen de 1 a 2 gramos de materia fecal son suficientes.

Transporte de la muestra

Las muestras deben remitirse según se muestra a continuación, tabla 3.



Tabla 3. Medios de transporte y temperaturas de envió.

| Microorganismo | <i>Salmonella</i> spp. | <i>Shigella</i> spp. | <i>E. coli</i> O157:H7 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Campylobacter</i> spp. |
|---------------------|------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Medio de transporte | Cary Blair | Cary Blair | Cary Blair | AIMES | Cary Blair |
| Temperatura | 0°C a 23°C | 0°C a 23°C | 0°C a 23°C | 0°C a 8°C | 0°C a 8°C |

Envío de los aislamientos al Laboratorio de Referencia.

Luego del procesamiento de muestras y obtención de aislamientos presuntivos bacterianos asociados a EDA - ETA, se realiza el envío de los aislamientos al LNR para su confirmación.

Procedimiento

- Realice una siembra masiva del aislamiento presuntivo en un medio no selectivo (Agar BHI o Agar Tripticasa soya, tripticasa soya con sangre 5%) de acuerdo a cada microorganismo
- incúbela en los tiempos, temperatura y atmosfera de acuerdo a cada microorganismo.
- Recoja con el escobillón del medio de transporte correspondiente el crecimiento bacteriano.
- Inserte el escobillón en el medio y cierre el tubo herméticamente.
- Rotule el tubo con la identificación de paciente y envíelo al Laboratorio de Referencia junto con el ficha de envío vigente y debidamente diligenciado.
- Enviar en sistema triple embalaje de acuerdo a las normas IATA
- Las muestras y aislamientos enviados al Grupo de Microbiología son: Sustancias Infecciosas Categoría B, “muestra para diagnóstico”



Imágenes: fuente Grupo Microbiología INS

2.4 Documentación requerida

Todo aislamiento de los enteropatógenos descritos en la presente guía, debe ser enviado con la siguiente documentación:

- Carta de solicitud del ensayo.
- Ficha de envío de aislamientos Programas EDA-ETA, vigente y debidamente diligenciado

2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico

Examen directo

No se realiza.

Medios y reactivos empleados en el procesamiento de identificación de enteropatógenos.

- Medio de transporte Cary-Blair

Este medio es utilizado para el transporte de muestras de materia fecal o de aislamientos, de microorganismos Gram negativos entéricos. El medio de transporte Cary-Blair es adecuado para el transporte de este tipo de muestra, debido a que sus escasos nutrientes y el pH de 8,4 mantienen al microorganismo viable y evita su replicación.

- Caldo Selenito cistina

Favorece el crecimiento de microorganismos de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. La peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, el selenito de sodio inhibe la flora Gram positiva y la mayoría de la flora entérica excepto *Salmonella* spp., durante las primeras 8 horas a 18 horas de incubación.

- Caldo Rappaport: – Vassiliadis

El caldo cuenta con una baja concentración de verde de malaquita, cloruro de magnesio y harina de soya para así obtener un mayor porcentaje de recuperación de *Salmonella* spp, además la reducción del pH a 5.2 mejora la selectividad.

- Caldo fraser

El caldo base fraser es recomendado para el enriquecimiento, aislamiento y cultivo de *Listeria monocytogenes*. La proteosa peptona, hidrolizado enzimático de caseína, extracto de carne, extracto de levadura son nutrientes esenciales para el desarrollo. Cloruro de litio inhibe el desarrollo de enterococos. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan esculina a esculitina que, junto con los iones férricos, forman un complejo marrón oscuro a negro. Citrato férrico amónico favorece el desarrollo de *L. monocytogenes*.

- Caldo Bolton

El caldo de enriquecimiento selectivo Bolton está diseñado para el enriquecimiento previo de *Campylobacter*, contiene nutrientes para ayudar a la resucitación de células lesionadas de manera sutil y está formulado para evitar la necesidad de una atmósfera microaeróbica.

- Agar de Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)

Medio selectivo y diferencial muy adecuado para la detección de enterobacterias patógenas exigentes, sobre todo del género *Salmonella* spp.

La baja cantidad de desoxicolato hace que la flora Gram positiva sea inhibida, pero en cambio permite el crecimiento de *Salmonella* spp., y *Shigella* spp con mayor facilidad que otros medios selectivos.

- Agar Hektoen Entérico (HE)

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento particularmente de las especies de *Shigella* spp., Contiene lactosa, sacarosa y salicina, *Salmonella* spp., y *Shigella* spp., no fermentan estos carbohidratos y, por otro lado, microorganismos como por ejemplo, *E. coli* fermentan uno o más de los hidratos de carbono hasta convertirlos en ácidos, causando cambio de color del medio.

- Agar Palcam o Oxford modificado

Medio selectivo y diferencial de *Listeria* spp., hidroliza la esculina contenida en el medio que en presencia de iones férricos forma un compuesto fenólico de color negro, contiene antibióticos que inhiben en forma total o parcial el desarrollo de la flora presente en la muestra y permitiendo la recuperación de *Listeria* spp.

- Agar CCDA

El medio CCDA se basa en la formulación original descrita por Bolton et al., que se desarrolló para reemplazar la sangre con carbón vegetal, sulfato ferroso y piruvato de sodio. Se logró una selectividad mejorada cuando la cefazolina en la formulación original fue reemplazada por cefoperazona como agente selectivo. La anfotericina B se ha agregado a la fórmula para suprimir el crecimiento de levaduras y contaminantes fúngicos que pueden ocurrir a 37 ° C, es adecuado para el aislamiento de *Campylobacter* spp

- Agar BHI (Brain Heart Infusion Agar- Agar infusión cerebro corazón) o Trypticasa de Soya

Son medios enriquecidos que contiene infusión altamente nutritiva, para el aislamiento de microorganismos pocos exigentes; por no ser selectivo, está libre de inhibidores lo que facilita su uso para pruebas de serotipificación, recolección de cepas, etc.

- Agar sangre de cordero al 5%

Este medio se emplea especialmente para el aislamiento, cultivo y determinación de reacciones hemolíticas de organismos fastidiosos. El agar base con la cual se trabaja fue desarrollada para cumplir con los requerimientos de nutrientes del agar sangre, mantiene los glóbulos rojos en un excelente estado de conservación y asegura unas reacciones hemolíticas típicas y bien determinadas; se utiliza con o sin sangre.

- Oxidasa

El dehidrocloruro de tetrametil-parafenilendiamina al 1% se emplea para la determinación de la citocromo oxidasa. Este reactivo actúa como aceptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno. En su estado reducido es incoloro pero en la presencia de la citocromo oxidasa C del microorganismo y el oxígeno atmosférico se oxida formando el azul de indofenol.

- Catalasa

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas.

- Agar citrato de Simmons

Algunas bacterias pueden obtener energía utilizando el citrato como única fuente de carbono. El medio utilizado para este fin no debe contener proteínas ni carbohidratos que sirvan como otra fuente de carbono. Las bacterias que utilizan el citrato, también puede extraer nitrógeno de las sales de amonio del medio,

produciendo hidróxido de amonio, éste compuesto alcaliniza el medio. El indicador azul de bromotimol es amarillo a pH menor de 6,0 y azul a pH mayor de 7,6.

- Triple Sugar Iron Agar - TSI

Medio que permite diferenciar bacilos entéricos Gram-negativos basándose en su diferente capacidad de fermentación a los tres azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) y producción de sulfhídrico. La degradación del azúcar da lugar a la formación de ácido que se detecta por un cambio de color del rojo de fenol que pasa de anaranjado a amarillo, mientras que si el medio sufre una alcalinización pasa de anaranjado a rojo/púrpura. Los microorganismos que sólo fermentan la glucosa, como *Salmonella* y *Shigella*, (que se encuentra en una concentración 10 veces inferior a los otros azúcares), si bien producen el viraje al amarillo, éste sólo se mantiene en la columna vertical (base del tubo) mientras que la superficie inclinada restablece el color rojo por oxidación del ácido. El color amarillo obtenido en la acidificación del medio producida por la fermentación de la sacarosa o de la lactosa es persistente. Los cultivos que contienen microorganismos capaces de formar sulfuro de hidrógeno (H₂S) presentan el característico precipitado negro. La producción de gas se observa por la formación de burbujas e incluso por la rotura del propio gel.

- Agar lisina hierro (LIA)

Este medio que permite determinar los microorganismos capaces de descarboxilar la lisina, produciendo un cambio de color del púrpura de bromocresol. Sin embargo, esta descarboxilación sólo se puede hacer en un medio ligeramente ácido, que se consigue con la fermentación de glucosa, por ello esta prueba está limitada a los microorganismos capaces de utilizar la glucosa. Cuando el pH del medio baja, el indicador vira a amarillo. Al alcalinizar el medio debido a la descarboxilación de la lisina, el indicador (púrpura de bromocresol) vira a rojo púrpura. Los cultivos que contienen microorganismos capaces de formar sulfuro de hidrógeno (H₂S) presentan un precipitado negro. Además pueden aparecer burbujas de gas, que pueden incluso desplazar el medio.

Este medio es útil en la identificación de algunas especies de *Salmonella*, las cuales son lisina descarboxilasa positivas en un 94,6%. *Salmonella* Paratyphi es lisina descarboxilasa negativa. La descarboxilación de la lisina se observa por la presencia de un color púrpura, en todo el medio. Esto se debe a la alcalinización del medio por la amina liberada: cadaverina.

- Agar urea

Este medio es recomendado para detectar la presencia de la ureasa especialmente de las especies del género *Proteus* también puede ser usado para otras enterobacterias, que hidrolizan la urea más lentamente, incubando el medio por un período más largo (48 horas). La urea al ser hidrolizada produce amonio que reacciona en solución formando carbonato de amonio, compuesto que alcaliniza el medio.

- Agar motilidad Gi

El agar Motilidad GI es un medio que se utiliza para la detección de la motilidad de los microorganismos y para la separación de los organismos en su fase móvil. El medio contiene infusión de corazón de gelatina semisólida que es adaptable para utilizar en ambos tubos y placas para estudios de motilidad.

Principios del procedimiento

- Azúcares para la fermentación de carbohidratos de enterobacterias

Todas las enterobacterias utilizan hidratos de carbono mediante una fermentación acida mixta, en la cual se produce finalmente una variedad de ácidos orgánicos que derivan del ácido pirúvico. Las pruebas de fermentación de carbohidratos se hacen con el fin de determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible. Los carbohidratos utilizados son: manitol, sorbitol, xilosa, rhamnosa, entre otros.

Procesamiento de coprocultivo para el diagnóstico de enteropatógenos

La identificación de enteropatógenos se establece de acuerdo a lo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Identificación de enteropatógenos

| | <i>Salmonella</i> spp | | <i>Shigella</i> spp | <i>E. coli</i> O157:H7 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Campylobacter</i> spp |
|---|---|---|--|---|---|--|
| Cultivo directo | Agar XLD y Hecktoen enterico | | Agar XLD y hecktoen enterico | No se realiza | No se realiza | No se realiza |
| Periodo de incubación | T°= 37°C ±1°C | | T°= 37°C ±1°C | No se realiza | No se realiza | No se realiza |
| | 18 horas a 24 horas | | 18 horas a 24 horas | | | |
| | Atmosfera aerobia | | Atmosfera aerobia | | | |
| Realizar suspensión de materia fecal (directa o de medio de transporte), en 2 mL de solución salina al 0,85%* | | | | | | |
| Caldo de enriquecimiento | Agregar ± 300µL de la suspensión en caldo Rappaport | Agregar ± 300µL de la suspensión en caldo selenito cisteina | No se realiza | Agregar ± 300µL de la suspensión en caldo selenito cisteina | Agregar ± 300µL de la suspensión en caldo fraser | Agregar ± 300µL de la suspensión en caldo Bolton |
| Periodo de incubación | T°= 40°C ±1°C | T°= 37°C °C ±1°C | No se realiza | T°= 37°C ±1°C | T°= 30°C ±1°C | a 37°C ±1°C por 6 horas |
| | 18 horas a 24 horas | 8 horas a 18 horas | | 8 horas a 18 horas | hasta por 72 horas | luego a 40°C ±1°C por 42 horas |
| | Atmosfera aerobia | Atmosfera aerobia | | Atmosfera aerobia | Atmosfera aerobia | atmosfera microerofilia |
| Cultivo del caldo de enriquecimiento en agar selectivo | Agar XLD y Hecktoen enterico | Agar XLD y Hecktoen enterico | No se realiza | Agar Mac Conkey Sorbitol | (solo esclulina positiva) Agar Oxford o Palcam | Agar CCDA |
| Periodo de incubación | T°= 37°C ±1°C | T°= 37°C ±1°C | No se realiza | T°= 37°C ±1°C | T°= 30°C ±1°C | T°=40°C ±1°C |
| | 18 horas a 24 horas | 18 horas a 24 horas | | 18 horas a 24 horas | 24 horas a 48 horas | 48 horas |
| | Atmosfera aerobia | Atmosfera aerobia | | Atmosfera aerobia | Atmosfera aerobia | atmosfera microerofilia |
| Lectura | Colonias lactosa negativa Con o sin producción de H ₂ S | | Colonias lactosa negativa sin producción de H ₂ S | Colonias sorbitol negativo | Colonias planas con halo marron | Colonias plana, seca/aceitosa pleomórficas, con brillo metálico. |
| Cultivo para identificación | Agar no selectivo: Brain Heart Infusion (BHI), Tripticasa Soya (TS) | | | | | Agar Tripticasa soya con sangre 5% |
| Periodo de incubación | T°= 37°C ±1°C 18 horas a 24 horas Atmosfera aerobia | | | | | T°=40°C ±1°C 48 horas atmosfera microerofilia |
| Pruebas Bioquímicas presuntivas | Citrato TSI LIA Urea Motilidad Gi | Citrato TSI LIA Urea Motilidad Gi | Citrato TSI LIA Urea Motilidad Gi | Caldo sorbitol LIA Motilidad Gi | Prueba de CAMP Gram Xilosa Rhamnosa Manitol | Gram Oxidasa Catalasa |

*Se puede utilizar esta suspensión para diagnóstico de *Vibrio cholerae*, ver Guía para la vigilancia de cólera

Reacciones Bioquímicas

En las tablas 4, 5, 6 y 7 se muestran las reacciones bioquímicas que son necesarias para la identificación de *Enteropatógenos*.

Tabla 4. Lectura de baterías bioquímicas para *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

| PRUEBA | <i>Salmonella</i> spp. | <i>S. Typhi</i> | <i>S. Paratyphi A</i> | <i>Shigella</i> sp. |
|--------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|--|
| Gram: Morfología Coloración | Bacilos Negativa | Bacilos Negativa | Bacilo Negativa | Bacilo Negativa |
| Hektoen Enterico - Lactosa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| Hektoen Enteric - Lactosa/ H2S | Negativa/positiva | Neg /pos ó neg | Negativa/ neg | Negativa/ neg |
| XLD- lactosa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| XLD- lactosa/H2S | Negativa/positiva | Neg /pos ó neg | Negativa/ neg | Negativa/ neg |
| XLD – decarboxilación Lisina | Positiva | Positiva | Negativa | Negativa |
| Citrato | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| TSI | K/A | K/A | K/A | K/A |
| Gas | ++/+++ | - | ++ | - |
| H ₂ S | +++/++++ | + | - | - |
| LIA | K/K | K/K | K/A | K/A |
| Urea | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| Motilidad | Positiva | Positiva | Positiva | Negativa |
| Orinitina | - | - | - | Positiva: <i>Sh. Sonnei</i> Negativa: <i>Shigella</i> spp. |
| Lisina | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo |
| Acetato | - | - | - | Positiva: <i>E.coli</i> inactiva Negativa: <i>Shigella</i> spp. |

Tabla 5. Lectura de baterías bioquímicas para *L. monocytogenes*.

| PRUEBA | Resultado |
|--------------------|--------------------------------------|
| Coloración de Gram | Bacilos o cocobacilos Gram positivos |
| Prueba de catalasa | Positivo |

| | | |
|--------------|--|------------------|
| Motilidad | Móvil en forma de sombrilla | |
| CAMP | Positivo en forma de cabeza de fosforo | |
| Fermentación | PRUEBA | Resultado |
| Fermentación | LIA | K/K |
| Fermentación | Gas | - |
| Fermentación | H ₂ S | - |
| | Fermentación de sorbitol | Negativo |
| | Movilidad | Móvil |

Tabla 6. Lectura de baterías bioquímicas para *E.coli* O157:H7

Tabla 7. Lectura de baterías bioquímicas para *Campylobacter* spp.

| PRUEBA | Resultado |
|--------------------|--------------------------------------|
| Coloración de Gram | Bacilos o cocobacilos Gram positivos |
| Prueba de oxidasa | Positivo |
| Prueba de catalasa | Positivo |

3 CONTROL DE CALIDAD

El grupo de Microbiología realiza la Evaluación Externa del Desempeño en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos EED-B-RA como control de calidad directo y de forma indirecta se realiza con él envió del 100% del total de los aislamientos de las muestras positivas y sospechosas que se procesen en cada LSPD.

4 VIGILANCIA DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

La vigilancia de los agentes bacterianos causantes de EDA y ETA, consiste en identificar y describir su circulación en variables relacionadas con sus características genotípicas, su estacionalidad y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención en especial primaria y secundaria así como estrategias de control.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y publicarlos en forma periódica en informes técnicos así como la construcción de repositorios institucionales donde fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso por la comunidad científica, médica, académica, administrativa del sistema de salud y el público en general.

5 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

Dentro de las funciones enmarcadas en la vigilancia por laboratorio del evento se encuentra:

- El laboratorio del Grupo de Microbiología realizará la confirmación de todos los aislamientos de los enteropatógenos descritos en la presente guía, procedentes de materia fecal obtenidos mediante la vigilancia por laboratorio EDA- ETA que sean enviados por los LSPD del país.
- El Grupo de Microbiología, apoyará al LSPD con asesoría técnica, medios de transporte y medio de cultivo en el caso de brotes o cuando se presente emergencias.
- Fortalecer la red nacional de laboratorios para la identificación de agentes bacterianos causantes de EDA.
- Realizar el control de calidad de la red a través del programa de evaluación del desempeño a los LSPD.

Funciones del laboratorio de Salud Pública (LSP)

- Recibir, confirmar y remitir al Grupo de Microbiología del INS, los aislamientos de los enteropatógenos descritos en la presente guía, obtenidos a partir de materia fecal, junto con la documentación requerida debidamente diligenciada.
- Participar en el programa de control de calidad que realiza el Grupo de Microbiología de la Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia (SRNL).
- Mantener una base de datos actualizada con los aislamientos recibidos por municipios y los resultados luego del procesamiento de los mismos.
- Retroalimentar los resultados de los casos a las IPS, direcciones locales y departamentales de salud para realizar las acciones necesarias con el paciente y ajustar los casos en el sistema de vigilancia.
- En caso de no poder realizar el procedimiento de identificación de acuerdo al protocolo establecido, solicitar apoyo diagnóstico y remitirá la muestra en medio de transporte adecuado, acompañado de la documentación requerida completamente diligenciado al Laboratorio del Grupo de Microbiología del INS.
- Verificar la capacidad diagnóstica de su red (insumos necesarios para recolección, envío, transporte y diagnóstico de muestras sospechosas de cólera por parte de las IPS), de acuerdo con la presente guía, siguiendo las especificaciones técnicas y normativas para el envío (utilizando el sistema de triple empaque).

Funciones de los laboratorios públicos y privados o referente para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda

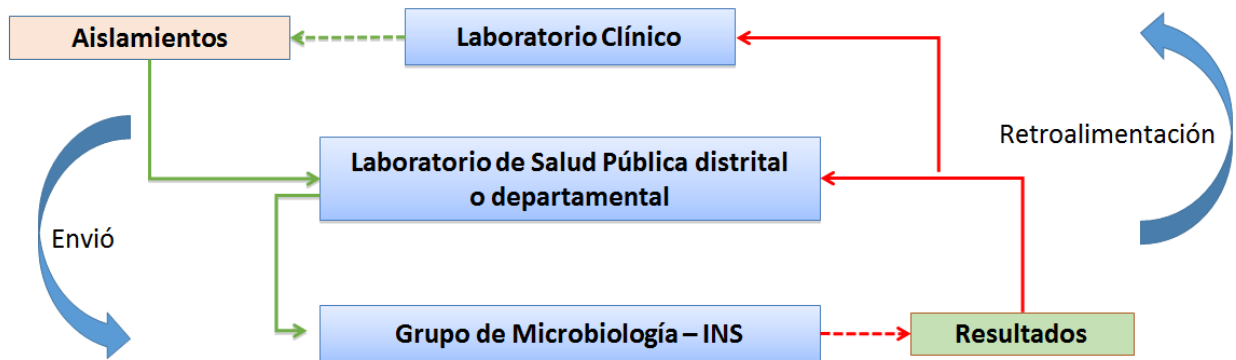
- El laboratorio clínico debe asegurarse que la muestra haya sido tomada correctamente, procesar la muestra de acuerdo al protocolo establecido, asegurándose de guardar un duplicado del

aislamiento obtenido para posibles eventualidades o tener la posibilidad de confirmar los resultados o realizar pruebas adicionales.

- En caso de no poder realizar el procedimiento de identificación de acuerdo al protocolo establecido, solicitara apoyo diagnóstico y remitirá la muestra en medio de transporte adecuado, acompañado de la documentación requerida y completamente diligenciada al LSPD.
- Hacer la notificación del caso según de forma inmediata al área de epidemiología.
- De ser necesario, pueden solicitar apoyo técnico para el análisis de los casos a las autoridades locales, departamentales o nacionales. prestando toda la colaboración y poniendo a disposición la información necesaria.
- Capacitar y actualizar permanentemente a los profesionales de la salud en el diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia de cólera.

El flujo de la información se genera desde el laboratorio de la IPS (pública o privada) hacia el LSPD y de este a nivel Nacional, y desde el nivel nacional se envía retroalimentación a los departamentos, de los departamentos a las IPS, figura 1

Figura 1. Sistema de referencia y contrarreferencia.



Fuente: Grupo Microbiología INS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
2. U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003758.htm>. Página actualizada: 09 julio 2014

3. Jean F. MacFaddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana, 2003.
4. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología 2011 Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Febrero de 2012
5. Perilla, M. J. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo; *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*
6. DE, T. Y. E. D. M., & Estudios, H. P. Diagnósticos de *V. cholerae*. (PROCED ALA/93/25), Quito, Ecuador. 2010
7. Gutiérrez M, Urbina D, Matiz A, Puello M, Mercado M, Parra P, et al. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. *Colomb Med*. 2005; 36 (Supl 3);36 (Supl 3):6-14.
8. Manrique-Abril FG, Tigne y Diane B, Bello SE, Ospina JM. Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Rev Salud Pública (Bogota)*. 2006;8(1):88-97.
9. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L. and Warnock D.W.: MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology (ASM) Press, 10th edition, Washington, D.C., 2011.
10. Miller SI, Pegues DA. Especies de salmonella, incluida *Salmonella typhi*. En: Mandell G, Bennet J, Dolin R, editores. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. 5ª ed. Madrid: Editorial Médica.
11. Panamericana; 2002. p. 2846-2869.
www.who.int/topics/typhoid_fever/es/index.html
12. Levine M.M. Immunization against bacterial diseases of the intestine. 2000 *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31:336-355.
13. <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Shigelosis.pdf>.
14. Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. 2008. Servicio Bacteriología Especial Departamento de Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
15. *Enfermedades diarreicas o Gastroenteritis agudas: Epidemiología de la Enteritis por Campilobacter* Publicado por Consuelo Ibáñez Martí el 24 mayo, 2010.
16. *E. coli* 0157:h7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en colombiasubestimado. Parte I *Revista MVZ Córdoba*, vol. 6, núm. 1, 2001, pp. 15-23, Universidad de Córdoba Colombia.
17. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
18. <http://www.elsevier.es/ficheros/booktemplate/9788475927220/files/imgs/Tabla18-2.jpg>
19. R. Jurado Jiménez et al. Fiebre tifoidea y otras infecciones por *salmonellas*. *Medicine*. 2010;10(52):3497-501
20. Perilla, M. J. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo; *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*.
21. WHO. *Enfermedades de transmisión alimentaria*. Organización mundial de la salud. Disponible en: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/.