

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES**

**Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales**

**Cátedra de Microbiología  
Carrera de Farmacia**

**Guía de Trabajos Prácticos**

Martha H. Von Specht

Liliana R. Ybarra

Gladis Jerke



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

**San Luis 1870**  
**Posadas - Misiones**  
**Tel-Fax: (03752) 428601**

**Correos electrónicos:**

edunam-admini@arnet.com.ar  
edunam-direccion@arnet.com.ar  
edunam-produccion@arnet.com.ar  
edunam-ventas@arnet.com.ar

**Colección:** Cuadernos de Cátedra

**Coordinación de la edición:** Claudio Zalazar

**Armado de interiores:** Javier B. Giménez

**Corrección:** Amelia Morgenstern

Ybarra, Liliana  
Guía de trabajos prácticos cátedra de microbiología / Liliana Ybarra; Martha Helena Von Specht; Gladis Jerke; coordinado por Claudio Oscar Zalazar - 1a ed. - Posadas: EdUNaM - Editorial Universitaria de la Univ. Nacional de Misiones, 2007.  
300 p.; 30x21 cm.  
  
ISBN 978-950-579-067-8  
  
1. Microbiología. 2. Esterilización. 3. Siembra. I. Von Specht, Martha Helena II. Jerke, Gladis III. Zalazar, Claudio Oscar, coord. IV. Título.  
CDD 576

Fecha de catalogación: 13/04/2007

ISBN: 978-950-579-067-8  
Impreso en Argentina  
©Editorial Universitaria  
Universidad Nacional de Misiones  
Posadas, 2007

## INDICE

Prólogo .....	7
Indicaciones básicas para trabajo en laboratorio .....	9
Normas de Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología .....	11
Trabajo Práctico 1. Métodos de esterilización y controles .....	13
Trabajo Práctico 2. Microscopía y examen microscópico en fresco .....	33
Trabajo Práctico 3. Tinción de microorganismos .....	43
Trabajo Práctico 4. Medios de cultivo .....	55
Trabajo Práctico 5. Siembra y aislamiento de microorganismos aerobios .....	67
Trabajo Práctico 6. Identificación de microorganismos aerobios .....	79
Trabajo Práctico 7. Siembra, aislamiento e identificación de microorganismos Anaerobios .....	99
Trabajo Práctico 8. Antimicrobianos .....	111
Trabajo Práctico 9. Control higiénico de medicamentos .....	123
Trabajo Práctico 10. Determinación del coeficiente fenol .....	143
Bibliografía .....	147



# CURRICULUM

## MARTHA HELENA VON SPECHT

### TÍTULOS

Bioquímica, Universidad Nacional de Misiones, 1989.  
Especialista en Microbiología Clínica, UNaM, Carrera de Especialización en Microbiología Clínica, 2000.  
Doctorado en Bioquímica de la UBA, área bacteriología, en curso.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

*Jefe de Trabajos Prácticos*, dedicación exclusiva Cátedra de Microbiología, desde 1989. Participación docente en las asignaturas: Higiene y Sanidad, Farmacia, y Microbiología de los Alimentos, Ing. Química.  
Docente de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, FCEQyN, desde 1997.  
Dictado de 5 cursos de post grado y 7 cursos generales.  
Directora de dos tesis de post grado carrera de Especialización en Microbiología y 15 Trabajos finales de grado carrera de Bioquímica.  
Integrante comisión de Residuos Tóxicos y Peligrosos FCEQyN, UNaM.

### ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

#### **Investigador Categoría III Programa Nacional de Incentivos.**

Co-directora de Proyectos de Investigación acreditados, área Bacteriología (UNaM). Integrante de proyectos internacionales (Vigilancia de resistencia a antibióticos, OMS y *Streptococcus pneumoniae* working group) con informes anuales presentados en reuniones internacionales. Capacitación de pasantes, becarios e investigadores en formación.

### PUBLICACIONES

Publicación de 12 trabajos en revistas científicas de circulación nacional e internacional. 58 presentaciones en congresos nacionales y extranjeros.

### OTRAS ACTIVIDADES

Bacterióloga del Laboratorio de Referencia de la Provincia de Misiones, Hospital Provincial de Pediatría de Misiones.  
Integrante del comité de Infecciones Hospitalarias del Hospital Provincial de Pediatría de Misiones.  
Referente de la Red de Meningitis y Neumonías Bacterianas de la Provincia, desde 2005.

## LILIANA ROSALBA YBARRA

### TÍTULO:

Licenciada en Genética. Universidad Nacional de Misiones, 1990.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

*Jefe de Trabajos Prácticos*, dedicación exclusiva en las Cátedras de Microbiología de la Carrera Farmacia y Biología de las Carreras Lic. en Genética, Prof. en Biología, desde 1994 e Ingeniería en Alimentos F.C.E.Q y N, UNaM. Participación docente en las asignaturas: Higiene y Sanidad, Farmacia y Microbiología de los Alimentos en Maestría en Tecnología de los Alimentos FCEQyN, UNaM desde 1997.  
Disertaciones en 5 Cursos de Grado y 1 Post-grado.

### ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

Investigadora Categoría IV Programa Nacional de Incentivos.

Directora de Área temática en Análisis físico-químicos de hierbas sápidas aromáticas y Yerba Mate compuesta, desde 2005. Integrante de proyectos de investigación acreditados en "Microbiología de Alimentos y medicamentos", desde 1986.

### PUBLICACIONES

Publicación de 4 trabajos en revistas científicas de circulación nacional e internacional. 39 presentaciones en congresos nacionales y extranjeros.

## **GLADIS JERKE**

### **TÍTULOS**

Bioquímica, Universidad Nacional de Misiones, 1991.  
Magíster en Tecnología de los Alimentos, UNaM, 2005.  
Especialista en Bromatología, Asociación Bioquímica Argentina, 2002.  
Especialista en Micología básica Asociación Argentina de Micología, 2003.  
Post-grado en Didáctica Superior Universitaria, Universidad del Norte, Encarnación.  
Doctorado en Ciencias. Universidad de Las Villas. Cuba. En curso.

### **ACTIVIDADES ACADÉMICAS**

*Auxiliar docente de primera*, dedicación semiexclusiva Cátedra de Microbiología Farmacia y Microbiología e Inmunología, Lic. en Genética, desde 1998. Participación docente: Higiene y Sanidad Farmacia.

Docente en Microbiología de los Alimentos, Maestría en Tecnología de los Alimentos, UNaM.

Docente de Bromatología y Microbiología general y de alimentos en la Universidad del Norte. Encarnación.

Disertante de Conferencias en Eventos científicos nacionales e internacionales. Dictado de 4 Cursos de grado y 3 de postgrado.

### **ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN**

Investigador Categoría IV Programa Nacional de Incentivos.

Directora de Proyectos de Investigación y de Extensión acreditados en la línea “Microbiología, hongos y micotoxinas en Alimentos vegetales”, desde 2002. Integrante de proyectos de investigación en la “Búsqueda de antimicrobianos en plantas regionales”, desde 2001 y en “Micología y Micotoxinas en alimentos”, desde 1993. Capacitación de pasantes, becarios e investigadores en formación.

### **PUBLICACIONES**

Publicación de 12 trabajos en revistas científicas de circulación nacional e internacional. 68 presentaciones en congresos nacionales y extranjeros. Autor de Norma IRAM 20517:2004.

## PRÓLOGO

La presente edición está destinada a los alumnos de la Carrera de Farmacia de la Universidad Nacional de Misiones.

Ha surgido como respuesta a la demanda de un texto actualizado que contemple aspectos teórico-prácticos que pueden servir de base para la enseñanza de Microbiología.

Los integrantes de la Carrera de Microbiología General elaboramos este material didáctico intentando presentar los conocimientos en forma clara, completa y actualizada, con la finalidad de brindar al alumno una guía de las actividades a desarrollar en el laboratorio.

Contiene guías de trabajos prácticos que abarcan los siguientes temas: Esterilización, coloración, siembra, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios y anaerobios, medios de cultivo, antimicrobianos, control higiénico de medicamentos, y coeficiente de fenol



## **INDICACIONES BÁSICAS PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

- Los alumnos deberán concurrir con guardapolvos, sin abrigos encima de estos y aquellos que posean el cabello largo deberán recogerse.
- La mesada se desinfectará al principio y al final del práctico con solución diluida de algún desinfectante adecuado para mesadas.
- Se trabajará siempre en las proximidades del mechero de Bunsen encendido ya que este proporciona un área estéril circundante de unos 30 cm.
- Todo el material de trabajo (placas, tubos, tapones, pipetas) debe estar estéril o deberá esterilizarse por flameado a la llama antes de utilizarse (ansas, portaobjetos, pinzas metálicas).
- Las placas de Petri se manipulan siempre con la tapa hacia abajo y la base que contiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Al destapar un tubo y antes de cerrarlo nuevamente se flameará su boca sobre el mechero.
- Al finalizar el trabajo práctico deberá ser desechado todo el material contaminado para su posterior esterilización.
- La mesada deberá quedar totalmente ordenada al finalizar el trabajo práctico.



# **NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

## **ACCESO AL LABORATORIO**

- Cualquier alumno que sufra alguna alteración de sus defensas o inmunocompetencia debe comunicarlo al profesor antes de comenzar las prácticas.
- El acceso al laboratorio de prácticas solo se permite a los alumnos que estén realizando las prácticas. No se admiten visitas por razones de seguridad.
- Los laboratorios de investigación son de acceso exclusivo del personal del Departamento.

## **NORMAS PARA EL ALUMNO**

- Es obligatorio utilizar batas/guardapolvos/chaquetillas abrochadas siempre que se esté trabajando en el laboratorio durante el periodo de prácticas. La bata no debe utilizarse fuera del laboratorio. Se recomienda asistir al práctico con zapatos cerrados.
- Debe respetarse la prohibición de beber, comer, masticar chicle o fumar en el laboratorio y se debe evitar llevar a la boca ningún objeto bolígrafos, o tocarse los ojos, nariz y boca.

## **BIOSEGURIDAD EN LA MESADA DE TRABAJO**

- En la superficie de trabajo no deben depositarse en ningún momento ropa u objetos personales.
- Cada alumno es responsable de la limpieza de su lugar de trabajo y del material asignado, así como de los microscopios que haya usado.
- Se deben usar los mecheros Bunsen con precaución, no dejando material inflamable cerca y evitando el posible contacto con el pelo y la ropa. Se comprobará que se haya apagado el gas al finalizar el experimento y al abandonar el laboratorio.
- Está prohibido pipetear con la boca.
- No se debe forzar un tubo de vidrio o la apertura de un frasco sin tener protegidas las manos.
- No se manejarán las autoclaves o el material recién esterilizado si no se dispone de guantes apropiados.

## **BIOSEGURIDAD EN LAS INSTALACIONES DE LABORATORIO**

- La eliminación de residuos, material desechable y material reciclable se realizará utilizando los contenedores dispuestos a tal efecto.
- Debe verificarse que estén cerradas las llaves del gas antes de abandonar el laboratorio.
- Se deben lavar las manos con jabón antiséptico ante cualquier sospecha de contaminación y siempre antes de marcharse del laboratorio.

## **MEDIDAS ANTE ACCIDENTES DE LABORATORIO**

Debe informarse inmediatamente al profesor encargado del grupo, en caso de:

- Un vertido accidental de material microbiológico.



# TRABAJO PRÁCTICO 1

## MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y CONTROLES

### OBJETIVOS

- Conocer diferentes metodologías de Esterilización y sus *controles*.
- *Adquirir entrenamiento en el acondicionamiento de diversos materiales de uso frecuente en el laboratorio de microbiología.*
- Discutir la necesidad de incluir controles de proceso.
- *Valorar el papel del Farmacéutico en el control de áreas estériles y en los sectores de esterilización de Sanatorios y hospitales.*

## INTRODUCCIÓN

Esterilización es un término absoluto que implica la pérdida de la viabilidad o la eliminación de todos los microorganismos contenidos en un objeto o sustancia, acondicionada de tal modo que impide su posterior contaminación.

Se entiende por pérdida de la viabilidad a la disminución irreversible de la capacidad de reproducción, sin que esto signifique necesariamente la destrucción o desaparición de la totalidad de las estructuras microbianas o de productos tóxicos derivados de estas. Por ejemplo, al esterilizar ciertos inyectables no pueden ser eliminados los pirogenos.

Eliminación se refiere a separar las estructuras microbianas presentes en un fluido, por ejemplo, por filtración. En este caso, tampoco se eliminan productos metabólicos, exotoxinas, etc., producidas por los microorganismos y que resultan filtrables.

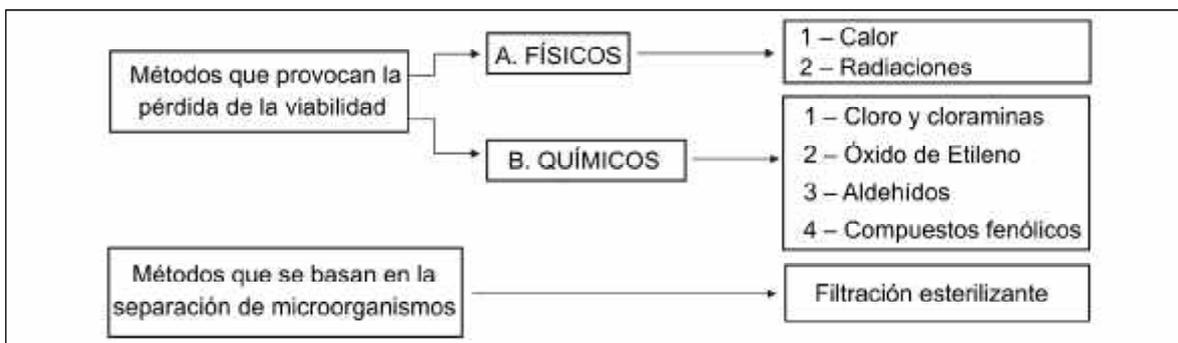
## MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

Para lograr la esterilización de un material determinado se cuenta con varios métodos cuya elección depende de:

- La sensibilidad del material al agente esterilizante.
- La penetrabilidad del agente en el material a esterilizar.
- La presentación del material (en un solo volumen grande o fraccionado).
- El uso posterior del material.

A excepción de la filtración esterilizante, que se basa en la separación física de los microorganismos contenidos en un fluido, todos los demás provocan *in situ* la pérdida irreversible de la capacidad de *reproducción* de los microorganismos expuestos. En estos casos, salvo excepciones, los productos de degradación microbiana permanecen asociados al objeto o sustancia ahora estéril.

Los métodos habituales de esterilización se detallan a continuación:



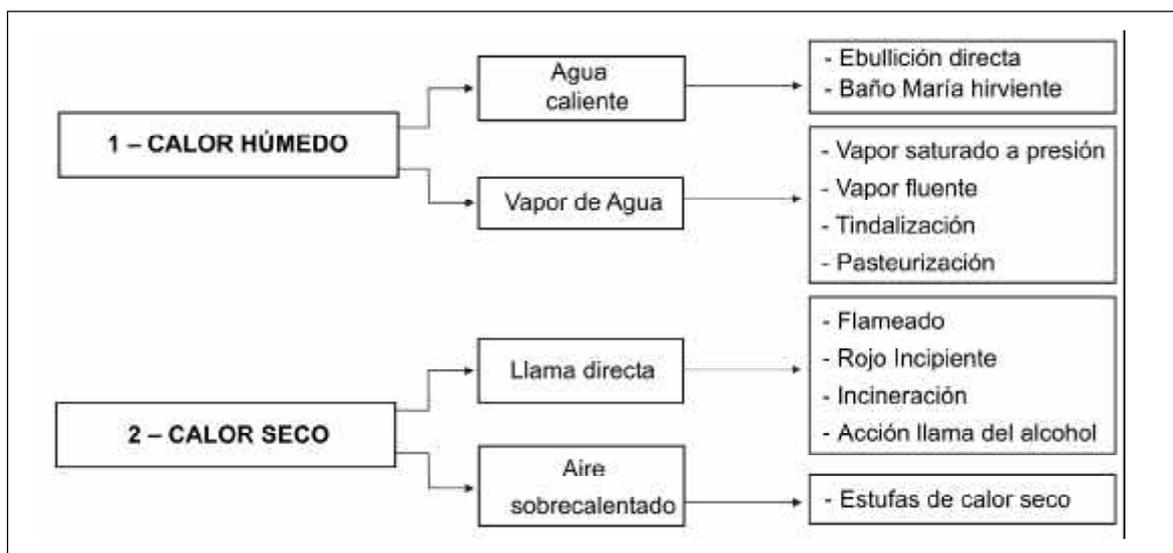
## MÉTODOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE LA VIABILIDAD

### A - MÉTODOS FÍSICOS

#### A - 1 - CALOR

Los métodos basados en la aplicación del calor como agente esterilizante son preferidos y aplicables a la mayoría de los materiales, medios de cultivo, soluciones, etc. Abarcan el empleo de:

1. Calor Húmedo
2. Calor Seco



Es imprescindible tener claro el concepto de que métodos incluidos en el cuadro, como ebullición directa, baño María hirviente y vapor fluente, son difícilmente controlables y de muy baja eficiencia en muchos casos. Solo deben ser usados como excepción en caso de emergencia, o cuando no puede ser utilizado otro método.

El proceso es rápido cuando se realiza eficientemente, el calor llega a toda la masa, actuando en lugares del material que podrían no ser alcanzados por la acción de agentes químicos.

Todos los microorganismos (aunque en distinto grado) son susceptibles a la acción del calor. El mecanismo de este como agente esterilizante implica desnaturalización proteica, fusión y desorganización de membranas y/o la ocurrencia de procesos oxidativos irreversibles. Cada uno de estos procesos incide en distinto grado sobre la pérdida de la viabilidad, según el método de esterilización empleado.

La acción deletérea sobre lípidos y proteínas requiere mayores temperaturas cuando el material está totalmente seco, o cuando la actividad del agua del medio se reduce por la presencia de altas concentraciones de sustancias neutras. Esto explica por qué se requiere mayor temperatura para causar un daño irreversible por calor seco. Además, el aire es un mal conductor del calor, y el aire caliente penetra mucho más lentamente que el vapor de agua en materiales porosos.

Aparte del tenor de humedad, las variables principales de un proceso de esterilización por calor son la temperatura y el tiempo de exposición.

#### A.1.1 - CALOR HÚMEDO

##### • Ebullición directa

Los hongos, la mayoría de los virus y las células vegetativas de varias bacterias patógenas, pierden la capacidad de reproducirse en unos pocos minutos a temperaturas entre 50°-70°C, y los esporos de varios agentes patógenos a 100°C.

Por ello es una práctica común, lamentablemente aun no abandonada, esterilizar agujas, jeringas e instrumentos de cirugía menor por calentamiento durante 10 a 15 minutos en agua hirviendo o en soluciones diluidas de álcalis en ebullición. Recordemos que estos métodos solo deben aplicarse en caso de emergencia, y el calentamiento no debe ser por un tiempo menor a 45 minutos, en recipientes donde el material a esterilizar no ocupe más de un tercio del volumen de agua contenido en él. Es conveniente aclarar que las esporas de algunos microorganismos saprofitos pueden soportar la ebullición durante horas.

• **Vapor saturado a presión**

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas. La conformación nativa de muchas estructuras biológicas (DNA, RNA, proteínas, etc.) se estabiliza por uniones puente de hidrógeno entre distintos restos de la cadena peptídico. Estas uniones son fácilmente reemplazadas por uniones puente de hidrógeno con moléculas de agua que es una especie química muy reactiva. Como consecuencia se forman productos tóxicos que podrían dañar a la célula.

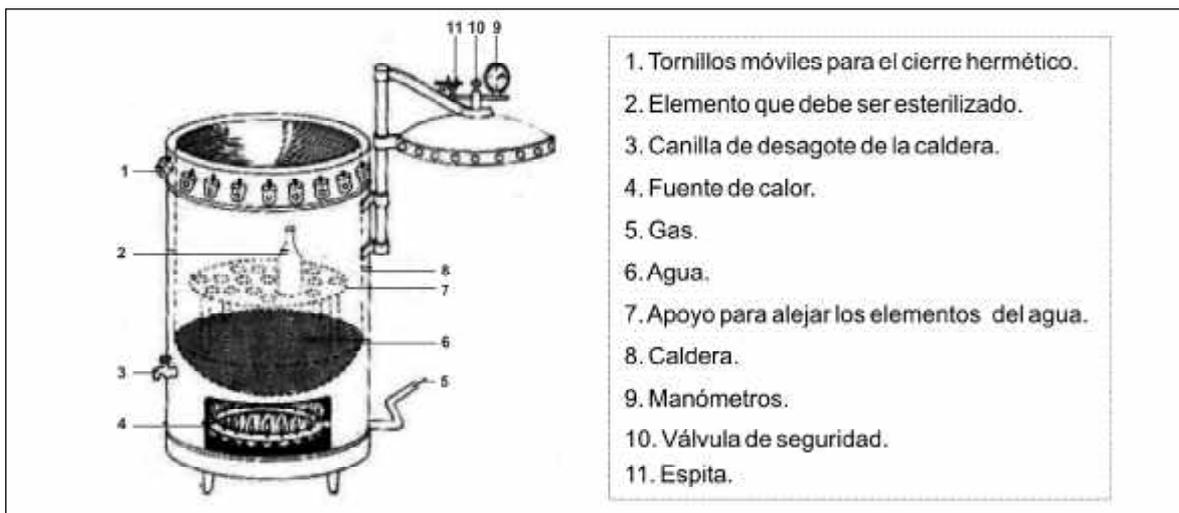
La rápida acción del calor depende, en parte, del alto valor del calor latente de vaporización del agua (540 cal.) que hace que los objetos fríos sean rápidamente calentados por condensación del vapor sobre su superficie.

Para lograr una esterilidad confiable, el método estándar es el vapor saturado a una atmósfera de presión en autoclave, a una temperatura de 121°C durante no menos de 15 minutos.

El autoclave es el aparato más comúnmente utilizado en los laboratorios para realizar la esterilización con calor húmedo. El autoclave o estufa de vapor es un método universal, que emplea vapor de agua saturado en un recipiente cerrado a presión, lo que produce un elevación de la temperatura, que se prolonga un determinado tiempo. Consta de las siguientes partes:

- Fuente de calor (a gas, querosén o eléctrica).
- Cámara de esterilización, por lo general cilíndrica, en cuyo fondo tiene un soporte (falso fondo), debajo del cual se carga agua hasta un determinado nivel. Sobre este soporte se dispone de una canasta (o bandeja) para acomodar los materiales que deben esterilizarse.
- Los aparatos de control: abarcan un termómetro, un manómetro, válvula de escape del vapor (espita) y válvula de seguridad.

El autoclave de Chamberland (Fig. 1.1) consta de: una caldera de cobre sostenida por una camisa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas (o un mechero eléctrico), esta se cierra por la parte superior mediante una tapa de bronce. Esta tapa posee 3 orificios: uno para el manómetro, otro para el escape de vapor en forma de robinete y el tercero para la válvula de seguridad que funciona con un contrapeso o con un resorte.



**Figura 1.1** Esquema de un autoclave Chamberland simple. (Tomado de Pumarola, Microbiología y parasitología médica, Pumarola).

En el uso del autoclave es muy importante permitir que el vapor fluyente desplace totalmente el aire de la cámara de esterilización antes de que la presión aumente. De no ser así, la presión resultante será la suma de las presiones parciales del aire y del vapor de agua. Teniendo en cuenta que para una misma presión la temperatura del aire es mucho menor que la del vapor de agua, la temperatura resultante será tanto menor cuanto mayor proporción de aire contenga la cámara.

Actualmente está muy difundido el empleo de autoclaves de tambor horizontal y con calentamiento eléctrico

#### **Aplicaciones de la esterilización por calor húmedo:**

La esterilización en autoclave se utiliza para todo el material termorresistente que no sea afectado por el vapor de agua. Se utiliza ampliamente para:

- Esterilizar medios de cultivos y soluciones. En el caso de líquidos, estos no deben formar emulsiones con el agua, como por ej. aceites o vaselinas. En estos casos se esterilizan por calor seco, en estufa, teniendo la precaución de que la temperatura de esterilización no sea superior a la de la descomposición del aceite
- Para destruir organismos formadores de esporas.
- Ropa de cama y material textil en general, siempre que el autoclave esté provisto de un sistema de secado al vacío.
- El material de vidrio puede ser esterilizado en autoclaves, pero luego debe ser secado. Por esta razón habitualmente se lo esteriliza en estufa.

#### **Ventajas del empleo del calor húmedo:**

- Rápido calentamiento y penetración del calor en el material a esterilizar.
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo.
- Hay un bajo deterioro del material expuesto.
- No deja residuos tóxicos.
- Económico.

#### **Desventajas del empleo del calor húmedo:**

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua.
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

#### **Precauciones de la esterilización en autoclave:**

- Eliminación total del aire de la cámara de esterilización.
- Los recipientes a colocar en los autoclaves no deben estar totalmente llenos (los recipientes se llenan hasta un 2/3 de su total).
- Los materiales o recipientes deben tener tapas flojas, o estar tapados con algodón con una sobretapa para permitir la ebullición libre y la liberación del aire evaporado.
- Con objetos porosos grandes, o grandes volúmenes de líquidos, se debe permitir un mayor tiempo de purgado.

#### **• Vapor fluyente**

Consiste en someter el material a la acción del vapor fluyente del agua, y se aplica corrientemente para esterilizar medios de cultivos que no pueden soportar una temperatura mayor a 100°C.

Para aplicar esta técnica se coloca el material, adecuadamente preparado, en el interior de un autoclave y se procede al calentamiento, dejando la espita abierta. El tiempo se computa desde que comienza a escapar vapor.

#### **• Tindalización**

Para la esterilización de ciertos líquidos o materiales semisólidos, que son fácilmente alterados por el calor, se emplea un método fraccional de esterilización denominado tindalización.

Consiste en el calentamiento del material a 80 o 100°C durante 30 min., tres días seguidos. Es decir, se somete a calentamiento el material durante el tiempo citado, luego una incubación a temperaturas entre 20 y 37°C durante 24 h.

Las células vegetativas y algunos esporos son destruidos durante el primer calentamiento, las esporas más resistentes son destruidas durante el segundo o tercer calentamiento dado que durante la incubación pasarían a la forma vegetativa.

Este método es muy útil en el caso de medios de cultivos sensibles al calor, soluciones albuminosas o azucaradas, sueros sanguíneos.

• **Pasteurización**

El principio general de la pasteurización es la destrucción selectiva de la población microbiana sensible al calor que se encuentra en la leche y otros alimentos.

Este proceso consiste en el calentamiento a temperaturas cercanas y no menores a los 62°C durante 30 min., seguido de un rápido enfriamiento.

La pasteurización elimina todos los gérmenes patógenos, no esporulados, dejando microorganismos sobrevivientes que producirán alteración del producto pasteurizado si no se la refrigera adecuadamente y que, además, son necesarios para la elaboración de los subproductos de la leche, tales como yogurt, queso, etc.

Cabe destacar que este método no “esteriliza”, sí reduce la carga microbiana no afectando las propiedades del material. La enterotoxina estafilocócica, que es termoestable, si está presente no es inactivada por pasteurización y puede causar una intoxicación alimenticia.

**A.1.2 - CALOR SECO**

Aquí son prioritarios los procesos oxidativos y de fusión de membranas por sobre la desnaturalización proteica. El calor seco produce desecación de la célula y efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos.

• **ACCIÓN DIRECTA DE LA LLAMA**

**Flameado:** se aprovecha la llama de un mechero Bunsen. Se utiliza para varillas y planchas de vidrio, espátulas, bocas de recipientes de vidrio, etc. Más que un método real de esterilización, *reduce la chance de contaminación ambiental.*

**Rojo incipiente:** consiste en calentar directamente a la llama, llevando hasta rojo incipiente y manteniendo unos segundos en este estado. Se utiliza para asas de platino, lancetas, agujas de disección, etc.

**Llama del alcohol:** se vierte una cantidad apropiada de alcohol que permita, al encenderlo, que su llama alcance toda la superficie a esterilizar durante varios minutos. Se utiliza para morteros, material de vidrio, material de cirugía, etc.

**Incineración:** consiste en el empleo de incineradores. Se utiliza para materiales biológicos, tales como tejidos patológicos, placentas, fluidos biológicos etc.

• **ACCIÓN DEL AIRE SOBRECALENTADO**

**Estufas u horno de esterilización por calor seco**

El agente esterilizante es el aire caliente seco. El proceso de esterilización requiere mayor temperatura y tiempo que en el caso de vapor saturado, ya que el aire tiene una menor capacidad para tomar, transportar y ceder el calor.

Debe permitirse la convección del aire no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

La temperatura de esterilización puede variar entre 140-170°C, requiriéndose distintos tiempos de esterilización (desde 5 horas a 140°C hasta 1 hora a 170°C). En caso de tratarse de material muy voluminoso o difícilmente penetrable por el aire, los tiempos deben ser aumentados.

El papel y el algodón, así como el material acondicionado con estos elementos, no deben esterilizarse a más de 160°C ya que se carbonizan.

En forma estándar, para material de vidrio: cajas de Petri, tambores con pipetas, etc. se utilizan dos horas a 160°C.

La estufa de esterilización (Fig. 1.2) es el artefacto utilizado en los laboratorios para esterilizar por calor seco. La estufa presenta una doble cámara, el aire caliente generado por una resistencia circula por la cavidad principal y por el espacio entre ambas cámaras. Se mantiene una temperatura estable mediante termostatos de metal, que al dilatarse por el calor cortan el circuito eléctrico. Debe permitirse la convección del aire no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

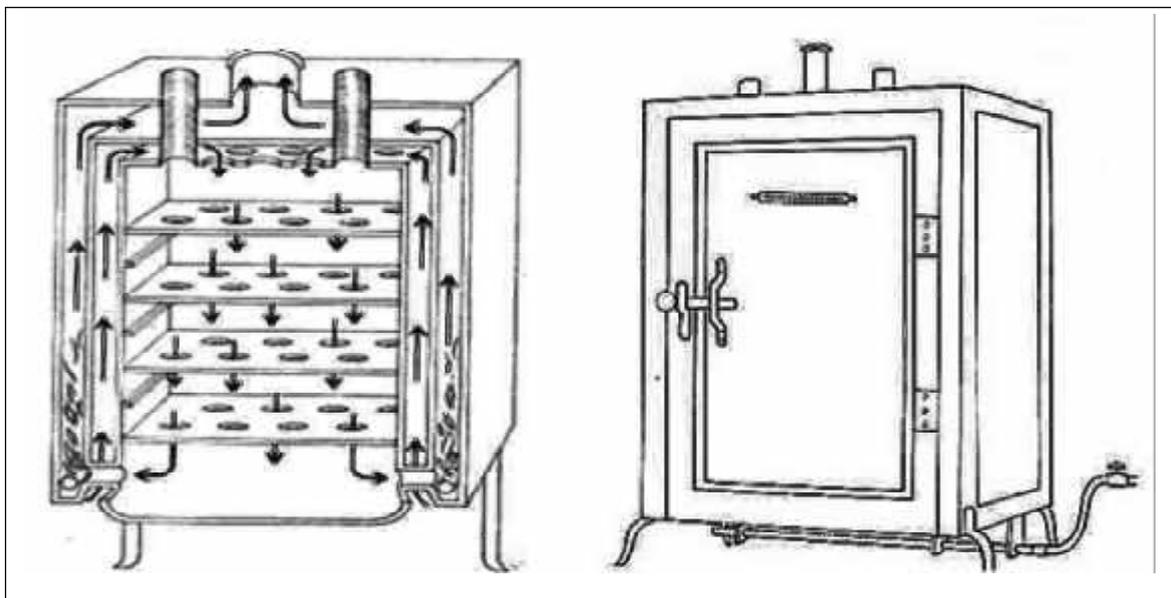


Figura 1.2. Corte esquemático de una estufa de triple pared. (Tomado de Microbiología y Parasitología médica. Fumarola)

**Aplicaciones del Método de esterilización por calor seco:**

- Instrumental cromado.
- Objetos de vidrio, aluminio y porcelana.
- Compuestos minerales termoestables en forma de polvo (talco, bórax).
- Vaselina, parafina, sustancias grasas y aceites.

**Ventajas del empleo de calor seco:**

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles.
- No moja el material por lo que no requiere secado posterior.

**Desventajas del empleo de calor seco:**

- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del aire caliente.

**A.2. - RADIACIONES**

Las que se utilizan en la práctica, pueden ser ionizantes como los rayos Gama o no ionizantes como los rayos ultravioleta.

**• Radiaciones ionizantes**

Se producen en forma primaria o secundaria, iones y radicales libres que llevan a alteraciones en las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas, lipídicas o algún componente esencial para la viabilidad de los microorganismos.

Las radiaciones gama se utilizan dada su gran penetrabilidad, principalmente para esterilizar materiales termolábiles (por ejemplo jeringas descartables, sondas, etc.) a escala industrial, ya que requiere la existencia de instalaciones complejas y costosas. No son utilizadas para medios de cultivo o soluciones proteicas porque se producen alteraciones de los componentes.

Las variables del método de esterilización son: a) la dosis a que se somete el material, b) el tiempo de exposición.

• **Radiaciones Ultravioleta:**

El principal mecanismo del efecto letal de la luz UV se atribuye a su absorción por el ADN y el resultante daño de este último.

Las radiaciones UV, con longitudes de onda entre 240 a 280 nm, afectan principalmente los ácidos nucleicos de los microorganismos, dado que uniones covalentes entre residuos adyacentes de pirimidinas forman dímeros, los que llevan a pérdida de viabilidad.

Estos distorsionan la forma del ADN e interfieren en el apareamiento normal de las bases, esto da como resultado inhibición de la síntesis de ADN y por lo tanto del crecimiento y la respiración.

## **B. MÉTODOS QUÍMICOS**

Estos agentes provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos. Son activos tanto para esporos como para células vegetativas. Dentro de los compuestos químicos podemos encontrar agentes antisépticos, esterilizantes y/o desinfectantes.

VARIABLES DE ESTERILIZACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS: concentración del agente, tiempo de exposición y pH.

### **1. Antisépticos (Bacteriostáticos)**

- Alcoholes.
- Iodo.
- Agentes iónicos, y anfóteros.
- Órgano Mercuriales.
- Colorantes.

### **2. Desinfectantes o Esterilizantes (Bactericidas)**

- Cloro y Compuestos clorados.
- Aldehídos.
- Oxido de Etileno.
- Compuestos Fenólicos.
- Ácidos y Alcalis.

#### **B.1. ANTISÉPTICOS**

• **Alcoholes**

Lesionan la membrana celular de los microorganismos y desnaturalizan proteínas celulares. Desorganizan la estructura fosfolipídica. No destruyen esporas y tienen una acción germicida lenta. Los alcoholes de cadena corta tienen un efecto nocivo mayor que los de cadena larga. Se utilizan en concentraciones del 50 al 70%. Los más utilizados son el etanol e isopropílico.

• **Iodo**

Es un agente oxidante que modifica grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos. Inactiva proteínas y enzimas por oxidación de los grupos -SH a S-S, pudiendo atacar también grupos amino, indoles, etc. Se utiliza como desinfectante de la piel (tintura de iodo: yodo molecular 2% y yoduro de sodio 2% en alcohol), aunque es irritante. Es efectivo contra esporas en una concentración de 1600 ppm de iodo libre.

• **Agentes iónicos y anfóteros**

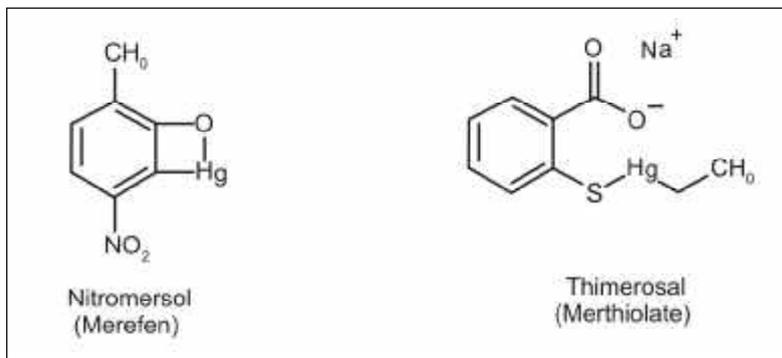
Son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que desordenan la disposición de las proteínas y de los fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, se interfiere con el metabolismo energético y el transporte activo.

No son esporicidas ni tuberculicidas aun en altas concentraciones. Sus principales ventajas se hallan en que son inodoros, no tiñen, no son corrosivos de metales, estables, no tóxicos y baratos.

- **Catiónicos:** sales de amonio cuaternarias. Tienen mayor actividad a pH alcalino y los Gram + son más susceptibles.
- **Aniónicos:** jabones y ácidos grasos. Tienen mayor actividad a pH ácido y son eficaces contra Gram +.
- **Anfóteros:** actúan como catiónicos o aniónicos según el pH.

• **Órgano Mercuriales**

Estos tipos de compuestos se combinan con los grupos -SH de las proteínas, inactivando enzimas. Dentro de los mercuriales orgánicos se encuentran el metafen y el mertiolate.



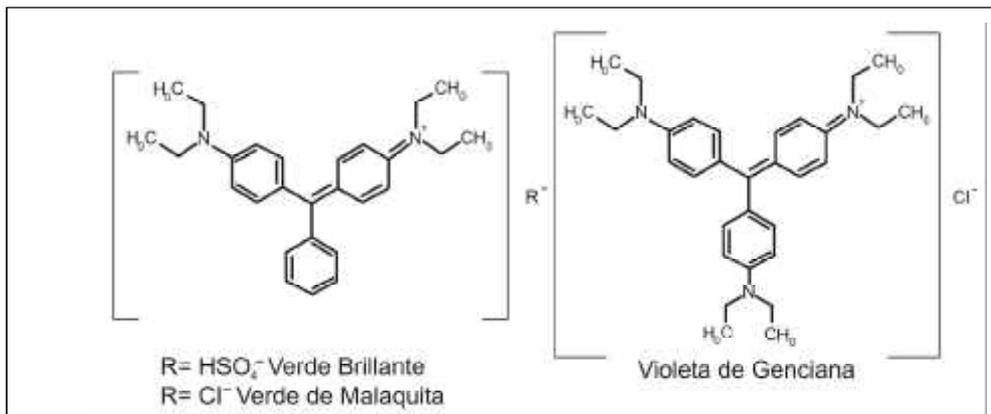
• **Peróxido de Hidrógeno**

Es un antiséptico débil, con capacidad oxidante y formadora de radicales libres.

Actualmente, el peróxido de hidrógeno gaseoso se está utilizando como desinfectante de superficies o descontaminante de gabinetes biológicos debido a que no posee las propiedades tóxicas y cancerígenas del óxido de etileno y formaldehído.

• **Colorantes**

Interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (acridina) o interfieren en la síntesis de la pared celular (derivados del trifenilmetano). La acridina se inserta entre dos bases sucesivas del DNA separándolas físicamente. Esto provoca errores en la duplicación del DNA. Los derivados del trifenilmetano (violeta de genciana, verde de malaquita y verde brillante) bloquean la conversión del ácido UDP-acetilmurámico en UDP-acetilmuramil-péptido.



## B.2. DESINFECTANTES Y/O ESTERILIZANTES

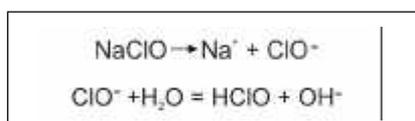
### • Cloro

El cloro, los hipocloritos y las cloraminas son desinfectantes que actúan sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos. *Oxidán grupos -SH*, y atacan grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina.

El producto clorado más utilizado en desinfección es el hipoclorito de sodio (agua lavandina), que es activo sobre todas las bacterias, incluyendo esporas, y además es efectivo en un amplio rango de temperaturas.

La actividad bactericida del hipoclorito de sodio se debe al *ácido hipocloroso* (HClO) y al Cl<sub>2</sub> que se forman cuando el *hipoclorito* es diluido en agua. La actividad germicida del ion hipocloroso es muy reducida debido a que, por su carga, no puede penetrar fácilmente en la célula a través de la membrana citoplasmática. En cambio, *el ácido hipocloroso es neutro y penetra fácilmente en la célula, mientras que el Cl<sub>2</sub> ingresa como gas.*

*El hipoclorito de sodio se comercializa en soluciones concentradas (50-100 g/l de Cloro activo), a pH alcalino y en envases oscuros que favorecen su estabilidad, pero es inactivo como desinfectante. A causa de esto, es que deben utilizarse soluciones diluidas en agua corriente (que tiene un pH ligera-*



mente ácido), con el objeto de obtener ácido hipocloroso. Generalmente, se utilizan soluciones con una concentración del 0.1-0.5% de Cloro activo.

Su actividad está influida por la presencia de materia orgánica, pues puede haber en el medio sustancias capaces de reaccionar con los compuestos clorados que disminuyan la concentración efectiva de estos.

### • Aldehídos

Son agentes alquilantes que *actúan sobre proteínas*, lo que provoca modificación irreversible de enzimas e inhibición de la actividad enzimática (Adición nucleofílica de grupos -NH<sub>2</sub> y -SH).

Se utilizan como desinfectantes y esterilizantes. Destruyen esporas.

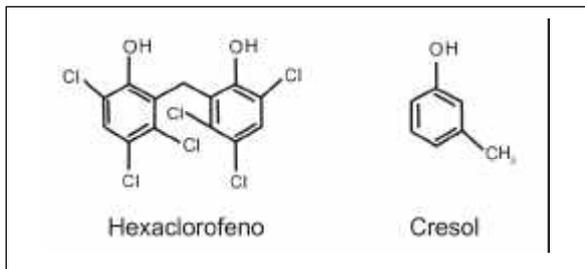
**Glutaraldehído:** consiste en preparar una solución alcalina al 2% y sumergir el material a esterilizar de 20 a 30 min. Y luego un enjuague de 10 min. Este método tiene la ventaja de ser rápido y ser el único esterilizante efectivo frío. Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, etc.

El **formaldehído** como gas se utiliza para descontaminar edificios, ambientes, etc. El formaldehído gaseoso se obtiene por calentamiento del paraformaldehído. Se utilizan las pastillas de formaldehído, las cuales pueden disponerse en el fondo de una caja envueltas en gasas o algodón, que después pueden ser expuestas al calor para una rápida esterilización (acción del gas formaldehído). También pueden ser usadas en estufas de formol, que son cajas de doble fondo, en donde se colocan las pastillas y se calienta hasta 60°C y pueden esterilizar materiales de látex, goma, plásticos, etc. Las pastillas de formalina a temperatura ambiente esterilizan en 36 hs.

El formaldehído tiene la desventaja de ser muy irritante y perder actividad en ambientes refrigerados.

### • Compuestos Fenólicos

Son desinfectantes que provocan lesiones en la membrana citoplasmática porque desordenan la disposición de las proteínas y fosfolípidos. Esto causa filtración de compuestos celulares, inactivación de enzimas y lisis.



El fenol no es usado a menudo como desinfectante por su olor desagradable, por ser muy irritante y por el residuo que queda luego de tratar las superficies.

Los derivados del fenol más utilizados son el hexaclorofeno (compuesto difenílico) y los cresoles (alquil fenoles). Estos son muy efectivos a bajas concentraciones contra formas vegetativas de bacterias. No son efectivos contra esporas.

**• Óxido de Etileno**

Es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhídricos, hidroxilos, etc.

Es utilizado en la esterilización gaseosa, generalmente en la industria farmacéutica. Sirve para esterilizar material termosensibles como el descartable y plástico, equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias, etc.

Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además cancerígeno.

**MÉTODOS BASADOS EN LA SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS**

**FILTRACIÓN ESTERILIZANTE**

Las membranas filtrantes son películas delgadas con poros de un tamaño determinado. El número de poros es muy elevado, llegándose a tener un volumen de alrededor del 80% del filtro.

Es fundamental elegir el sistema filtrante teniendo en cuenta la compatibilidad con los fluidos a filtrar. Así tendremos que tener en cuenta la temperatura de trabajo, y la naturaleza química de aquellos, ya que actualmente existen materiales con distinta resistencias térmicas y químicas (acetato de celulosa, teflón, nylon, etc.).

Para esto se deben realizar ensayos de resistencia del material a las condiciones de uso, extractos en distintos medios (es imprescindible conocer el uso que se le va a dar al filtrado, ya que en casos especiales se solubilizan algunos aprestos del filtro que pueden resultar tóxicos cuando se destina el medio a cultivos celulares).

El tamaño del poro va a depender del uso a que vamos a someter el sistema. Así podemos utilizar como ejemplo esta guía:

Diámetro del poro	Usos
0.1 0.2 micras	Filtración Esterilizante
0,45 micras	Análisis de coliformes en Aguas
5 micras	Análisis de células en fluidos corporales

Debemos recordar que no se retienen virus ni micoplasmas, los últimos tienen un tamaño que oscila entre 150 - 300 μ y están en el límite de separación según el tamaño del poro de la membrana que se utilice.

Los poros no deben ser imaginados como agujeros de una criba, ya que no son regulares. Muchos son de un tamaño mayor que el rotulado pero esto no afecta la eficiencia de la operación ya que

no solo se retienen partículas por un efecto de tamiz, sino que también son retenidas en la matriz del filtro, al lograrse recorridos de más de 500 veces el diámetro del poro.

Las partículas mayores van a ser retenidas en la superficie, y las de menor tamaño serán atrapadas en la matriz del filtro.

Esto es particularmente importante en la filtración del aire, ya que partículas mucho menores que el tamaño del poro son retenidas por atracción electrostática, impacto, etc.

La capacidad del sistema es otro punto a considerar. El tamaño de la membrana va a estar relacionado con el volumen a filtrar. Así, generalmente las membranas de 13 a 25 mm de diámetro, van a ser utilizadas para volúmenes de 1 a 25 ml, normalmente contenidas en una jeringa. Duplicando el diámetro, se cuadruplica la capacidad.

Para volúmenes muy grandes, o para sistemas de uso continuo, se utilizan cartuchos en cuyo interior las membranas se encuentran súper plegadas, aumentando así el área útil en relación al volumen del equipo.

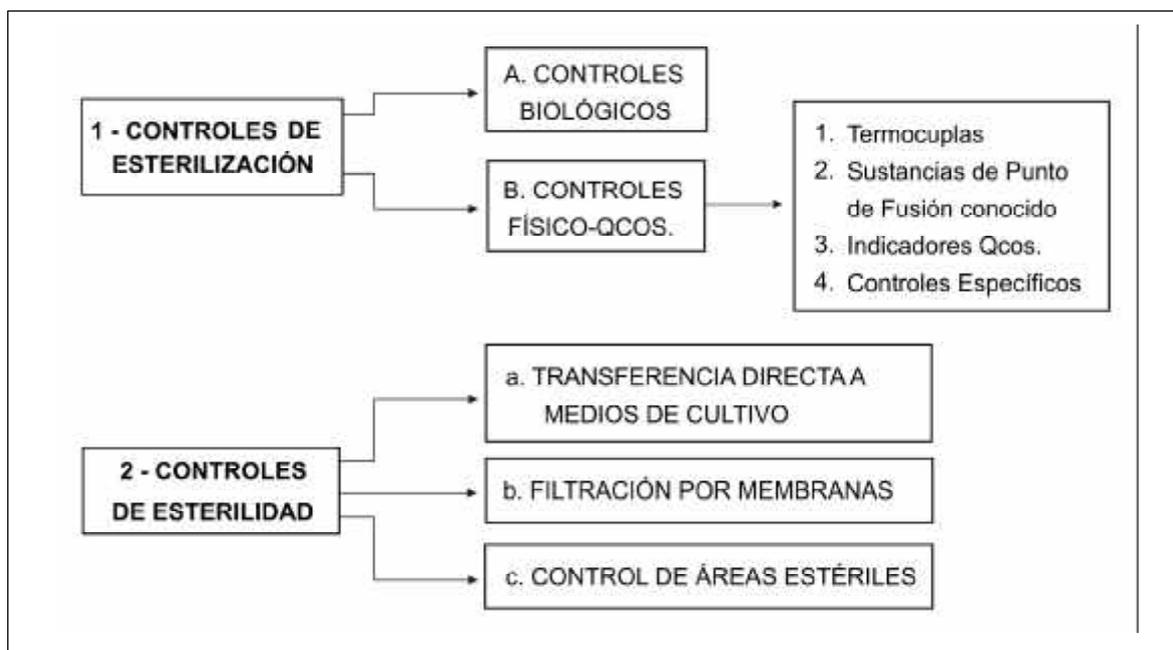
Los sistemas de filtración a través de fibras presentan una serie de desventajas: desprendimiento de fibras que contaminarán el filtrado, modificación de las características químicas de la solución (amianto), gran absorción del material, baja velocidad de filtración.

Cuando el sistema va a ser utilizado como esterilizante, podemos utilizar algunos microorganismos como indicadores. Así para filtros de 0,2  $\mu$  se utilizan suspensiones de *Pseudomonas diminuta*, no debiéndose encontrar el filtrado *contaminado* con estos microorganismos.

### CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN Y DE ESTERILIDAD

Es necesario realizar controles para asegurar que el proceso de esterilización utilizado ha sido el adecuado, así como también para evaluar el buen funcionamiento de los equipos.

**Controles de Esterilización:** son aquellos controles que se realizan para determinar si todas las condiciones del método empleado en la esterilización de un determinado producto u objeto fueron cumplidas.



**Controles de Esterilidad:** son aquellos controles que se realizan sobre alícuotas del material esterilizado, con el objeto de comprobar la total ausencia de microorganismos en el mismo.

## 1. CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

### 1. A - CONTROLES BIOLÓGICOS DE ESTERILIZACIÓN

Están constituidos por cepas de microorganismos de resistencia conocida al agente esterilizante, es decir, una resistencia superior a la que presentan los contaminantes comunes, de tal manera que una suspensión de estos gérmenes colocados en lugares representativos del elemento esterilizante, permita asegurar que su esterilidad representa un índice seguro de esterilidad del conjunto.

Como ya se dijo, estos controles se colocan entremezclados con el material a esterilizar y preferentemente en aquellas zonas donde sea más difícil la penetración del agente esterilizante.

Comúnmente se los utiliza impregnados en soportes para facilitar su manipulación.

**Estos pueden ser:**

a.- Tiras de papel inoculadas, envueltas en envases individuales.

b.- Ampollas con medio de cultivo incorporado (Self Contained), en los que el dispositivo inoculado con el microorganismo entra en contacto con el medio de cultivo, una vez activado el dispositivo, mediante la ruptura del contenedor de dicho medio de cultivo (generalmente una ampollita de cristal contenida en el interior de la ampolla principal de plástico). El resultado se observa mediante el cambio (+) o no (-) del color inicial del medio de cultivo.

Cabe acotar que este sistema no se puede aplicar para el control de aquellos productos que son elaborados asépticamente, o esterilizados por filtración.

Para estos casos se emplean un sistema de control por filtración a través de membranas, las cuales luego de ser tratadas se transfieren asépticamente a un medio adecuado, para su posterior análisis.

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	INDICADOR
Vapor (Autoclave)	<i>B. stearothermophilus</i>
Calor Seco (Estufa)	<i>C. tetani</i> (Cepa no Patógena)
Óxido de Etileno	<i>B. subtilis</i> (Var Niger); <i>B. globigii</i>
Radiaciones Ionizantes	<i>B. pumilus</i>

Indicadores Biológicos Sugeridos Por La USP. XIX Edición.

### 1. B. CONTROLES FISICOQUÍMICOS DE ESTERILIZACIÓN

Son dispositivos diseñados y calibrados para detectar fallas en los parámetros de esterilización. Su función principal es controlar la homogeneidad de dichos parámetros en las distintas zonas de la carga o lote de esterilización.

Su colocación es en el interior de paquetes y envases y, de ser posible, en los sitios internos del producto.

**1\* Termocuplas.** Sirven para controlar la distribución homogénea del calor durante el proceso de esterilización.

Estas consisten en sondas que son colocadas en los puntos de dudosa distribución junto con la carga a ser procesada, registrando de esta manera la Temperatura dentro del recinto. Se trata de dos metales que están en contacto entre sí, y por diferencia de temperatura generan una corriente, permitiendo determinar la temperatura en función de la intensidad de corriente generada.

Mediante una ampliación del equipo podemos registrar la Temperatura dentro del recinto y el Tiempo en que esta misma se mantiene.

**2\* Utilización de Sustancias de Punto de Fusión conocido:** se utilizan sustancias que fundan a la temperatura de esterilización o justo por debajo de la misma. Por ej., para las autoclaves (T= 121°) se suele utilizar Anhídrido Succínico por que funde a 120°. Para aquellos procesos a 115° se pueden utilizar Azufre con un punto de fusión (115°) o Acetanilida que tiene un punto de fusión (116°), Antipirina con un punto de fusión (114°).

Estas sustancias pueden venir selladas en tubos capilares o también en dispositivos que permiten medir en forma conjunta la Temperatura y el Tiempo de esterilización.

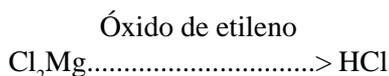
**3\* Indicadores Químicos:** son aquellos indicadores que sufren modificaciones generadas por el tratamiento por calor sobre reactivos especiales y que generalmente se ponen en evidencia por cambio de coloración a través de indicadores de pH.

Basadas en el mismo principio existen esterilómetros, que son tiras de papel marcadas con óxidos minerales que cambian de color al alcanzar determinadas temperaturas.

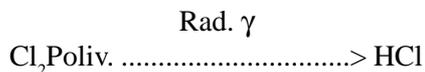
Modernamente estas tiras viran de color de forma sectorial e indican no tan solo que se ha alcanzado la temperatura, sino que también el tiempo. Cada sección precisa de mayor tiempo de acción para que vire de color.

**4\* Controles Específicos de esterilización:** existen además los controles de esterilización específicos para cada caso en particular por ejemplo:

**a.- Oxido de etileno:** se utilizan sobres de polietileno que contiene solución de MgCl<sub>2</sub>, y un indicador de pH, el cual permite medir la penetración del gas a través de las paredes. Esto se pone en evidencia por el desprendimiento de HCl, tras la exposición al agente esterilizante.



**b.- Radiaciones.** Se utilizan trozos de cloruro de polivinilo coloreado, cuyo color vira por la liberación de HCl. Sirve como un método de control del agente esterilizante.



**c.- Filtración.** Los filtros que se utilizan para la filtración deben ser validados. El factor más importante para validar un filtro de 0,22 es la elección del microorganismo.

La FDA recomienda utilizar para filtros de 0,2 μ suspensiones de *Pseudomonas diminuta* (*Brevudimona diminuta*). Este microorganismo es la bacteria más pequeña hallada en un proceso farmacéutico, su tamaño es de 0,68 mm por 0,31 mm, no debiendo encontrarse el filtrado contaminado con este microorganismo.

Para la validación de filtros de 0,1 mm se utilizan micoplasmas de la especie *Acholeplasma laidlawii*, cuyo tamaño es de 0,27 mm por 0,27 mm.

La validación de las membranas de nanofiltración utiliza virus, como ser el virus de la polio, el reovirus 3, el SV 40, el virus de la leucemia o el HIV.

También se utilizan aerosoles de Dioctil Ftalato, que dan partículas de 0,3 m, definiéndose la eficiencia del sistema en función del porcentaje de retención de estas partículas.

**d.- Controles de esterilización de autoclaves**

Resulta indispensable la revisión y el control del perfecto funcionamiento del autoclave, durante toda su vida útil, ya que es un equipo que trabaja soportando altas presiones de vapor. Se requieren realizar las siguientes pruebas:

**Pruebas de Presión Hidráulica:** esta se realiza sometiendo a la autoclave a un exceso de presión no inferior al 50% de la presión de trabajo, como resultado no se debe observar pérdida de líquido en ninguna de las conexiones, ni deformaciones en la cubierta, ni en el fondo.

**Pruebas de Vacío** (para control de Hermeticidad): se controla la seguridad de las válvulas y el tiempo de conservación de vacío en la autoclave cerrada, además se puede determinar las posibles fugas entre ambas cámaras, produciendo el vacío en una de ellas, con la válvula de comunicación cerrada y comparando la diferencia de presión. Se puede emplear también esta prueba para controlar la eficacia de la bomba de vacío, determinando el tiempo en que se logra la mínima presión.

**Pruebas para el control de la distribución homogénea del calor:** se utilizan termocuplas o termómetros de máxima convenientemente distribuidos en los puntos de dudosa homogeneidad.

## 2 - CONTROLES DE ESTERILIDAD

Las pruebas de esterilidad se fundan en un análisis estadístico que tienen por objeto revelar las contaminaciones por microorganismos. La experiencia ha demostrado que ningún proceso de esterilización, ni aún superando los ensayos de esterilidad, puede ofrecer absoluta seguridad sobre la separación de todos los gérmenes. Lo más que se puede conseguir es una probabilidad de que el producto sea estéril aun cuando en algunos casos esa probabilidad sea muy grande.

Existen dos métodos para llevar a cabo este test:

- a) Transferencia directa a medios de cultivo.
- b) Filtración por membranas.

Se tomará un porcentaje preestablecido del material esterilizado que dependerá del tamaño del lote. El mismo se recogerá de los lugares donde haya una mayor dificultad para la llegada del agente esterilizante.

### 2. A. TRANSFERENCIA DIRECTA A MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO	TIPO	PERIODO DE INCUBACIÓN	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN
Tioglicolato	Anaerobio-aerobio.	7 días	30° - 35°C
Digerido de Caseína Soja	Aerobio	7 días	20° - 25°C
Sabouraud	Aerobio.	10 días	22° - 25°C
Caldo peptonado	Aerobio.	10 días	32° - 35°C
Caldo glucosado	Aerobio.	10 días	32° - 35°C

Consiste en transferir una muestra representativa a medios de cultivo apropiados que permitan el desarrollo de cualquier tipo de agente contaminante. Para ello está determinado en farmacopea los medios y las condiciones de cultivo. Estos medios son:

Para la realización del Test de esterilidad se toma la muestra, se transfiere a los medios y se incuba durante 14 días. Se analiza el crecimiento por turbidez o por crecimiento superficial.

- Si no se observa crecimiento se dice que la muestra cumple con el control de esterilidad.
- Si se observa crecimiento pero se cree que se ha cometido errores durante el test, se declara invalido y se repite.
- Si no se han cometido errores durante el test y se observa crecimiento es que la muestra no está estéril.

Se debe ensayar también la capacidad de los medios utilizados para promover el crecimiento microbiano con la finalidad de evitar falsos resultados. A este ensayo se lo llama Test de promoción de crecimiento el cual se realiza con microorganismos patrones que presentan marcadas exigencias nutricionales.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO
Tioglicolato	<i>Bacillus subtilis</i> (aer.) <i>Candida albicans</i> (aer.) <i>Bacteroides vulgatus</i> (aer.- anaer.)
Digerido de Caseína Soja	<i>Bacillus subtilis</i> (aer.) <i>Candida albicans</i> (aer.)

Los medios deben ser inoculados con baja cantidad de microorganismos e incubados luego durante 7 días, al cabo de los cuales debe observarse abundante desarrollo.

Se debe prestar atención a la presencia de sustancias con propiedades bacteriostáticas o fungistáticas, para prevenir un falso negativo.

Para estos test se siembran los medios de cultivo con los microorganismos de ensayo, pero colocando además un alícuota de la muestra a testear, se los incuba en las condiciones señaladas y debe observarse igualdad de crecimiento como cuando no se había colocado la alícuota de la muestra. En caso contrario se demuestra la propiedad inhibitoria de la muestra, y por lo tanto se varían las condiciones del ensayo.

## 2. B. FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Para este método el sólido o el líquido se disuelven en solventes adecuados y se filtra a través de membranas de 0,45 - 0,20  $\mu$  de poro, que sean capaces de retener las posibles bacterias presentes en la muestra. Luego se toma asépticamente el filtro, se divide y se siembra en los medios anteriormente citados.

Por ejemplo, para el ensayo de esterilidad de inyectables con vehículo aceitoso, se procede de la siguiente manera: se filtra el aceite con ligero vacío a través de un filtro de membrana, que luego se lava con una solución de 0,1% de Triton X100<sup>R</sup>, para quitar los restos de aceite, a su vez los restos del tensioactivo se eliminan por lavado con solución de peptona al 0,1%; luego se procede a dividir el filtro y se siembra en los medios adecuados.

## 2. C. CONTROLES DE ESTERILIDAD DE LAS ÁREAS ESTÉRILES

La mayoría de los contaminantes ambientales son partículas microscópicas que se mantienen en el aire un largo tiempo y que según su tamaño pueden recorrer largas distancias antes de sedimentar.

En la industria farmacéutica es necesario contar con recintos en donde el nivel de contaminación sea lo más baja posible, como en áreas de preparación de inyectables, productos liofilizados y aquellos productos que no se esterilizan en su envase final.

El control de estos recintos se realiza **exponiendo placas de Petri** con medio nutritivo sólido en diferentes lugares de los locales. Estas placas se dejan abiertas durante un tiempo variable (30- 60').

La cuenta de las colonias que resultan luego de la incubación, permite estimar la eficacia de la esterilización y también las zonas de contaminación.

La **filtración de aire a través de membranas filtrantes** que se colocan luego en medios nutritivos, es otro recurso de interés.

Otro procedimiento es la **toma de aire con Captadores Andersen**, que son captadores de aire provistos de medios nutritivos gelosados. La capacidad de captación de aire es de 0,3 m<sup>3</sup>/min. durante

tiempos variables de 5´ a 15´. En forma paralela se utilizan placas de Petri fijas, sobre el piso o las superficies de trabajo, durante tiempos variables. El control se realiza una o dos veces por semana.

Para probar la calidad del flujo laminar que se aplica es importante determinar el tiempo de retorno del ambiente a la esterilidad luego de la contaminación; para esto se disemina en la sala un aerosol muy concentrado de *Serratia marcencens* que se deja en suspensión 15´.

Luego se pone en marcha el flujo laminar durante 1´, al cabo de este tiempo se instalan Captadores Andersen y placas de Petri, contándose las colonias que se forman luego de la incubación.

# DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 1

## PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Los alumnos seguirán las instrucciones del docente, realizando las actividades que sean necesarias para lograr materiales estériles para su posterior empleo en las prácticas microbiológicas, seleccionando las mismas a partir de la siguiente secuencia de eventos que resume el ciclo del material de laboratorio de microbiología.

### 1- ESTERILIZACIÓN PREVIA

Únicamente para material y equipo que haya sido utilizado con material infeccioso.

- a- Tubos, placas de Petri, frascos, etc.: Autoclave 1 Atm. 30 minutos.
- b- Pipetas: como anterior o sumergir completamente durante un día en solución desinfectante (Formalina, Fenol, Lisol, Creolina, Hipoclorito de sodio, etc. - al 10%).

### 2- LIMPIEZA

- a- Raspado para eliminar partes gruesas de suciedad.
- b- Hervido durante 10 minutos en solución jabonosa (o detergente).
- c- Cepillado individual de cada pieza, en solución tibia.
- d- Enjuagado 5 a 8 veces con agua corriente (caliente si es posible). Para pipetas: hacer pasar una corriente de agua a presión, conectándolas a la canilla mediante un tapón de goma perforado.
- e- Enjuague final 2 a 3 veces con agua destilada.

### 3- SECADO

En canastos de alambre, boca hacia abajo. A temperatura ambiente, o en estufa a 60 - 80 °C.

### 4- REVISIÓN

Todo material de vidrio que quede manchado será sumergido en solución sulfocrómica durante 24 horas; luego un buen enjuagado, cepillado con o sin jabón según sea necesario, y nuevo enjuagado 8 veces en agua corriente.

### 5- PREPARACIÓN

**Tubos y frascos:** tapón de algodón, dispuestos en canastos de alambre, la boca hacia arriba y cubierto todo con papel.

**Placas de Petri:** envolverlas individualmente en papel. También de a 2 o 3.

**Pipetas:** filtro de algodón en la parte superior y luego envueltas en papel arrollado bien ajustado.

**Agujas y jeringas:** envueltas en papel o en tubos especiales. Previamente cubrir el émbolo con una delgada capa de vaselina líquida. (Si se esterilizará en autoclave, preparar las dos partes de la jeringa desarmada).

**Frascos con tapa esmerilada:** envolver la parte superior o totalmente en papel. (Si se esterilizará en autoclave, deberá colocarse una tira de papel entre la tapa y el cuello del frasco, para que permita entrar el vapor).

### 6- Esterilización Final

Material de vidrio o metal en general con tapones de algodón o cierre no hermético; jeringas desarmadas, agujas: Autoclave 1 atmósfera, 20 minutos.

Material de vidrio o metal cerrado con tapa hermética; jeringas armadas: Exclusivamente en estufa, 160°C, 2 hs.

Tindalización o Filtración por Seitz, etc., para los medios que se alteran con el calor fuerte.

Autoclave 11 a 15 Lbs. Según el caso, por 15 minutos. Medios de cultivo

Exclusivamente autoclave 12 a 15 Lbs., por 15 minutos o ebullición si ha de usarse enseguida.  
Material de goma e Instrumental.

Exclusivamente en estufa a aire seco, 170°C por 2 hs. Cera, vaselina, aceites, talcos.

*Cada alumno dispondrá el material preparado para esterilizar en estufa o autoclave según corresponda.*

## ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

### MANEJO DEL AUTOCLAVE

- 1 - Verificar el estado general del equipo y limpieza interior.
- 2 - Llenar con agua la concavidad del fondo (no sobrepasar los orificios de la bandeja), colocar el falso fondo perforado y sobre este los recipientes a esterilizar, debidamente acondicionados.
- 3 - Colocar la tapa en posición, ajustando los tornillos móviles en cruz, para evitar el descentrado.
- 4 - Abrir la espita para purgar y colocar el tubo de goma largo sumergido en una lata con agua fría.
- 5 - Eliminación de aire interior: encender el mechero (con la llama al máximo), y verificar la purga del aire mantenido en el interior del autoclave. Cuando el aire interior se elimina totalmente, el sonido del burbujeo se hace metálico, con golpes secos del vapor que reemplazó a aquel. El purgado generalmente lleva 10 minutos desde el momento en que comienza a hervir.
- 6 - Comprobada la total eliminación del aire interior, cerrar la espita suavemente.
- 7 - Retirar el tubo de goma del agua de control de borboteo. Regular el mechero para un aumento regular y lento de la presión.
- 8 - Un vez alcanzada definitivamente la estabilización de la indicación manométrica, en la presión de trabajo para la esterilización, controlar su constancia, regulando la llama del mechero (fuego del mechero al mínimo o fuego corona).
- 9 - Controlar el tiempo de esterilización a partir del momento de estabilización de la presión en el valor deseado (generalmente 15 minutos a 1 Atm de presión).
- 10 - Apagar el mechero.
- 11 - Dejar enfriar completamente. Esperar a que se descomprima el aparato, el manómetro debe volver a cero.
- 12 - Abrir la espita a fin de igualar las presiones dentro y fuera del autoclave.
- 13 - Abrir los tornillos móviles en cruz.
- 14- Si se ha de volver a esterilizar nuevamente, reponer agua fría en el fondo, caso contrario limpiar y secar perfectamente.

### QUÉ NO DEBE HACERSE

NUNCA purgue demás, ya que variará el volumen de los medios, soluciones, etc. Recuerde que está hirviendo.

NUNCA cierre la espita fuertemente. Las sales del agua y el efecto de la dilatación de los metales harán que no la pueda abrir con facilidad una vez finalizada la esterilización.

JAMÁS abra el autoclave si la presión manométrica no está en cero. Recuerde que la presión que indica el manómetro está por encima de la normal. Es decir, autoclavar a 1 Atm, significa a 1 Atm por encima de la presión atmosférica normal (760 mm Hg.). La descompresión brusca:

- a) daña el aparato y
- b) desprende los tapones de tubos y Erlenmeyer.

## ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

Normas generales de uso de Estufa de Esterilización

- 1 - Cargar la estufa en forma tal que:
  - a) No impida la convección de aire.
  - b) El material no toque las paredes.
- 2 - Controlar la posición del termómetro (el bulbo no debe tocar la carcasa metálica ni la puerta) pues se podrían registrar temperaturas falsas mayores a las reales.
- 3 - Poner en funcionamiento.
- 4 - Cuando alcanza la temperatura deseada, comenzar a contar el tiempo de esterilización.
5. Terminado el tiempo de esterilización, dejar enfriar antes de retirar el material.

## CONSERVACIÓN DEL MATERIAL ESTERILIZADO

- Material que haya sido esterilizado en autoclave: secar papel y tapones de algodón dejando en estufa a 37°C un día.
- Medios de cultivo: igual tratamiento para secado y para control de esterilidad.
- Material con envoltura de papel rota o perforada: envolver y esterilizar nuevamente.
- Todo material esterilizado será guardado en cajones o armarios al abrigo de la tierra, a fin de evitar contaminaciones.
- Medios de cultivo serán conservados en la heladera (hasta que se observa desecación en los medios sólidos). Algunos medios no admiten conservación por largos períodos, (los medios comunes pueden conservarse a temperatura ambiente largos períodos si son tapados con tapones de goma esterilizados, bien ajustados).

*Pasado un cierto tiempo, de uno a tres meses sin haberse usado el material, este deberá volver a esterilizarse.*

## CONTROL BIOLÓGICO DE ESTERILIZACIÓN

Objetivo. Se procederá al control biológico de los procesos de esterilización para calor seco y húmedo.

### MATERIALES NECESARIOS:

- 1. Microorganismos:** papeles de filtro impregnados con esporos de *Bacillus Stearothermophilus* y *Bacillus Subtilis variedad meger (globigii)*.
- 2. Medios de cultivo:** disponer de 7 tubos de hemólisis esterilizados, con 3 a 5 ml. del medio de cultivo.

### Composición:

Peptona.....0,5 %  
 Extracto de carne.....0,3 %  
 Glucosa.....1 %  
 Púrpura de Bromocresol (indicador de pH)

- 3. Pipetas** de 5 a 10 ml. estériles.
- 4. Ampolleta** para control de autoclave.

## MÉTODOS

### Control de esterilización de la Estufa

A) Colocar en cada uno de los 7 tubos una tira de papel de filtro impregnada en una suspensión de esporos de *Bacillus Stearothermophilus* y someterlos a los siguientes tratamientos:

TUBO 1: Sin tratamiento (control de viabilidad de esporos).

TUBO 2: Calor húmedo (110° durante 30') a vapor fluente.

TUBO 3: Calor húmedo (121°C, 1 Atm., 15') a presión de vapor.

TUBO 4: Calor seco (160°C durante 5').

TUBO 5: Calor seco (160°C durante 15').

TUBO 6: Calor seco (160°C durante 60').

TUBO 7: Sin tratamiento (control de medio de cultivo).

B) Incubar cada tubo a 50°C durante 7 días. Se realiza la lectura a las 24 hs. y a los siete días. Se procede a leer, anotar e interpretar los resultados.

### Control de esterilización del Autoclave

Para este método se disponen de ampollas comerciales, las que se ubican junto al material a esterilizar en lugares donde la esterilización es más dificultosa.

Transcurrido el tiempo de esterilización poner a incubar estas ampollas y un control sin autoclavar, a 56°C durante 24 a 48 hs.

## TRABAJO PRÁCTICO 2

### MICROSCOPIA Y EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

#### OBJETIVOS

- Reconocer la utilidad de la microscopía en la observación del mundo microbiano.
- Observar y reconocer estructuras celulares en un examen en fresco empleando diferentes técnicas.
- Valorar la importancia de esta observación como herramienta microbiológica.

### INTRODUCCIÓN

Las células bacterianas no se ven con facilidad al microscopio óptico debido a que su índice de refracción es similar al de la mayoría de los medios en suspensión acuosas, sin embargo suspendidas en glicerol, en soluciones no acuosas o teñidas, pueden ser observadas. Los flagelos y pelos no se ven por que están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico.

### MICROSCOPIA

La microscopía es la ciencia de los usos y aplicaciones interpretativos de los microscopios.

Los dos objetivos principales de la microscopía son:

- la formación de una imagen magnificada con la menor cantidad posible de defectos ópticos;
- el logro del contraste, que se basa en la observación diferencial de la luz entre la muestra estudiada y su medio.

El microscopio óptico se utiliza para ver bacterias que varían desde 0.5 a 10 micrómetros de tamaño (Fig. 1).

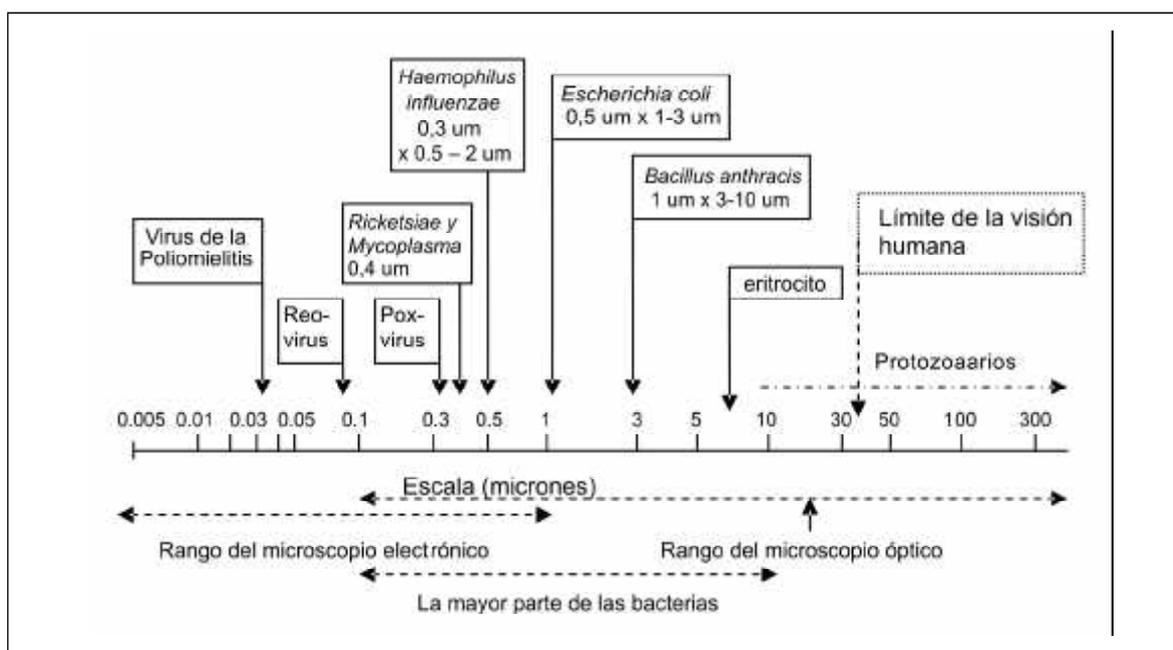


Figura 2.1: Escala representativa. Tamaños relativos (Tomado de Microbiología, Zinsser).

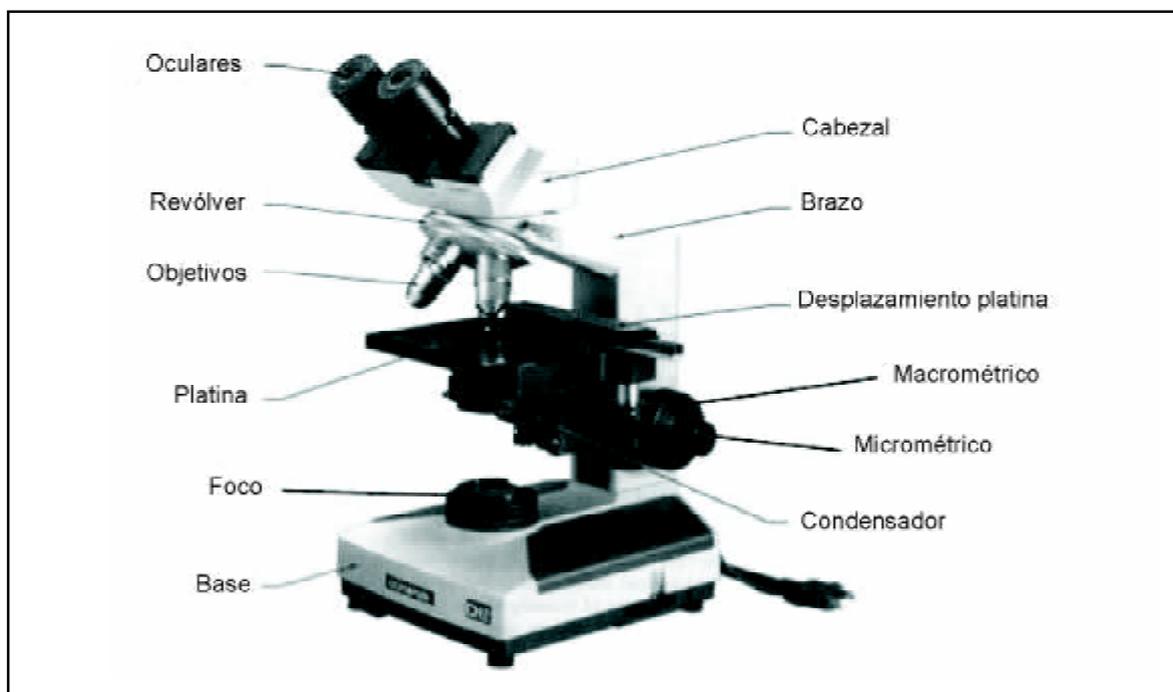
## EL MICROSCOPIO ÓPTICO

**El Microscopio óptico consta los siguientes sistemas:**

1. Sistema de soporte o parte mecánica del microscopio.
2. Sistema de iluminación.
3. Sistema óptico.
4. Sistema de ajuste o enfoque.

**1. Sistema de soporte:** también denominada parte mecánica del microscopio. Se denomina parte mecánica del microscopio al conjunto de elementos que tienen por objeto realizar las operaciones de sostén y movimiento del sistema óptico compuesto por: columna, tubo, platina y subplatina.

El pie es la parte sobre la que asienta el microscopio. El brazo sostiene en realidad todo el equipo de lentes al que se une por un sistema de cremallera. El revólver es una pieza giratoria en la que se enroscan las lentes objetivas (3/6). El cabezal es el dispositivo que sostiene los oculares, dentro del mismo se ubica el prisma que dirige la imagen a cada ocular. La platina es el sitio donde se coloca la muestra, ajustada por el carro que es un dispositivo que permite, mediante tornillos de mando, efectuar desplazamientos de atrás adelante y de derecha a izquierda.



*Figura 2.2: Microscopio Óptico (Tomado de [www.rcb.ufmg.br](http://www.rcb.ufmg.br)).*

**2. Sistema de iluminación:** está constituido por las siguientes partes: fuente de luz, espejo, condensador, diafragma y filtros.

Como fuente de luz puede utilizarse la luz natural o luz artificial eléctrica (foco). El espejo se coloca debajo del condensador en los microscopios desprovistos de fuente luminosa y sirve para reflejar la luz natural o de un foco luminoso externo, dirigiendo los haces a través del condensador.

La regulación de la luz que ilumina al objetivo es de gran importancia en el estudio de las bacterias.

**El condensador,** se emplea para concentrar los rayos de luz sobre la preparación, para el examen de inmersión (100X), el condensador se eleva al nivel de la platina, para lograr el máximo de luz. (Ej. Coloración Gram). En la estructura del condensador está incluido el diafragma.

**El diafragma** controla el diámetro del círculo de luz, asegura que la luz que sale del condensador llene exactamente el lente objetivo. Cuando se lo cierra, puede impedir el pasaje de los haces

luminosos, con lo cual suelen a veces mejorar la visualización de algunos detalles microscópicos. (Ej. En el examen en fresco: condensador bajo y diafragma cerrado para 40X).

Generalmente los bajos aumentos requieren: condensador bajo, y diafragma casi obturado y, los aumentos grandes (lente de inmersión): condensador alto y diafragma completamente abierto.

Existe una extensa variedad de filtros para utilizar en las observaciones microscópicas. Habitualmente el más usado es el filtro azul, que suministra una luz en las preparaciones donde prima el color azul, disminuyendo la intensidad del rojo.

**3. Sistema óptico:** comprende las lentes denominados objetivos y oculares (ver más abajo Tipos de objetivos). También incluyen los prismas que forman parte de los microscopios binoculares.

El microscopio compuesto lleva esta denominación por estar formado por dos sistemas de lentes:

- La lente por la cual mira el observador es el ocular que funciona como una lupa y sirve para observar y aumentar la imagen real formada por el objetivo.
- La lente más próxima al objeto se llama objetivo.

**Los OBJETIVOS se pueden clasificar en cuatro grupos:**

**1. Objetivos secos:** en ellos se interpone directamente el aire y la lente frontal. Según su aumento se distinguen el seco débil (de poco aumento 10x), y el seco fuerte (10x o 45x).

**2. Objetivos de inmersión:** entre la lente frontal y el objeto se interpone un líquido de índice de refracción superior al aire, por ejemplo, aceite de cedro (líquido viscoso que no se seca y es refractivamente estable).

Los menores aumentos del microscopio se emplean para el estudio de colonias bacterianas, movilidad general y morfología de mohos y levaduras, pero si se quieren ver detalles morfológicos de las bacterias debe emplearse el objetivo de inmersión.

**3. Objetivos especiales:** como los de los siguientes microscopios:

- a) Campo Oscuro: se utiliza para el examen de microorganismos no teñidos en suspensiones líquidas Ej. Espiroquetas.
- b) Contraste de fases: se usa para visualizar bacterias vivas y para revelar algunos detalles de su estructura interna, cápsula, endosporas, partículas citoplasmática y pared celular.
- c) Interferencia: se utiliza para lograr un efecto de profundidad y dimensionalidad.
- d) Ultravioleta: utilizan radiaciones de menor longitud de onda situadas en el espectro ultravioleta, se utiliza para la observación de espiroquetas.
- e) Fluorescencia: se utiliza actualmente para localizar antígenos y anticuerpos en las células o tejidos.

**4. Objetivos de corrección:** como en todo sistema óptico, es necesario corregir en los objetivos los fenómenos de aberración cromática y de esfericidad para una mayor nitidez en las imágenes.

La amplificación total de un microscopio compuesto es el producto de las amplificaciones de sus lentes objetivo y ocular.

Una propiedad importante de un microscopio es su **poder de resolución**, o sea su capacidad para mostrar como distintos y separados dos puntos que se encuentran cercanos. A mayor poder de resolución, mayor es la definición de un objeto.

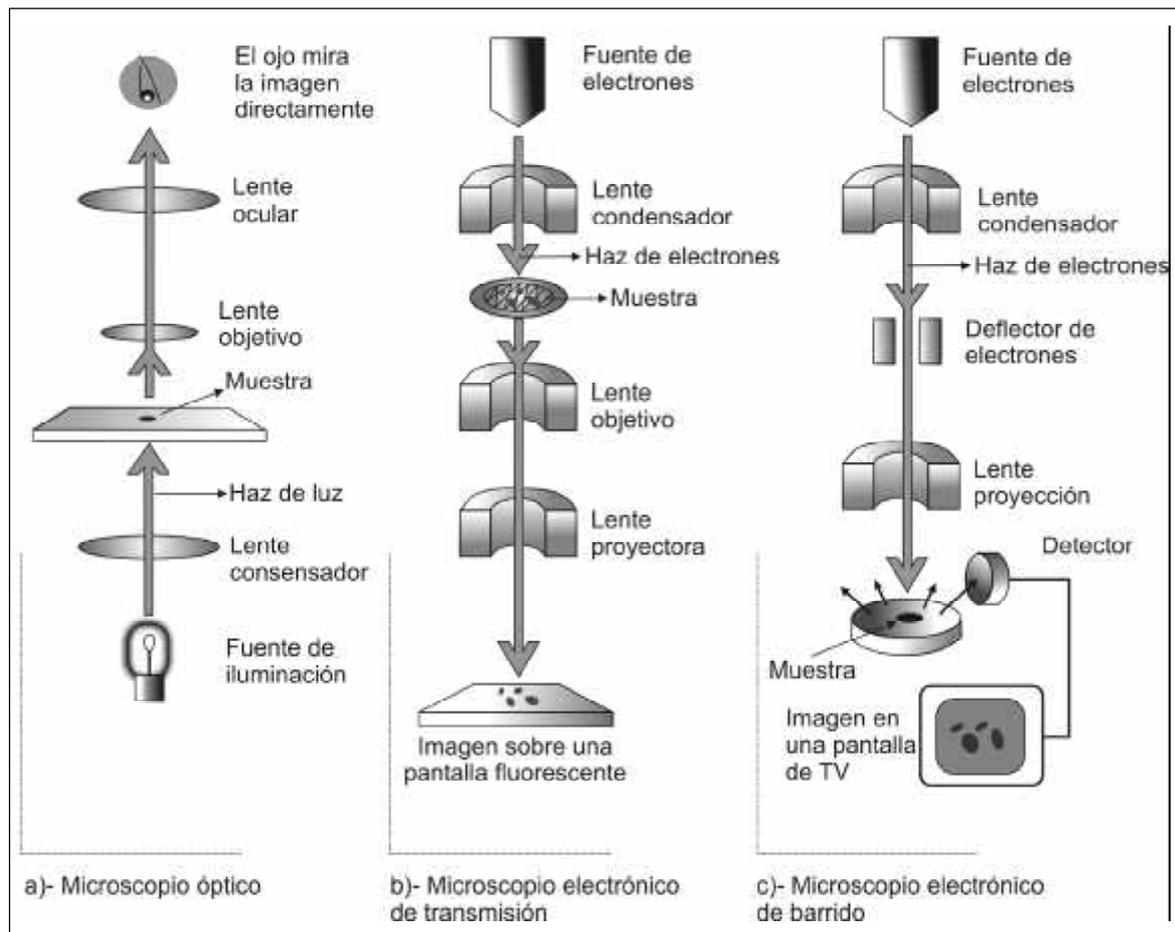
La resolución más alta posible en un microscopio de luz compuesto permitirá ver un objeto cuyo diámetro es de  $0,2\mu$  (micrómetro) o  $0,0002$  mm.

**4. Sistema de ajuste o enfoque:** compuesto por los tornillos macro y micrométrico y el condensador. Para lograr la formación de la imagen en el microscopio, se dispone de dos tornillos con ruedas de cremallera, que permiten hacer movimientos de ascenso y descenso del tubo óptico, el macrométrico ejecuta movimientos mayores o groseros y, el micrométrico (perilla de menor tamaño), realiza movimientos finos o pequeños. El condensador puede ser regulado en sus movimientos de ascenso y descenso.

## EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

El microscopio electrónico presenta mayor poder de resolución y permite la observación de componentes estructurales de membranas y estructuras subcelulares como los flagelos, Pili, etc. *Al M.E. no se observan tejidos vivos.*

El límite de resolución alcanzado es muy superior al M.O. Ej. 100.000 X, como después pueden ampliarse las fotografías obtenidas el aumento puede ser mucho mayor hasta 1.000.000 X.



**Figura 2.3:** Esquema de un microscopio óptico (a) frente al microscopio electrónico de transmisión (b) y el microscopio electrónico de barrido (c).

La fuente de luz está constituida por un filamento de tungsteno calentando por una corriente eléctrica que emite un haz de electrones. Emplea un haz de electrones en vez de un haz de luz.

Este haz es concentrado sobre el objeto por la acción de un primer campo magnético que hace las veces de condensador. Una vez atravesado el objeto, los electrones se someten a la acción de otro campo magnético que actúa como objetivo formando una imagen real, aumentada o invertida del objeto (Fig. 2.3).

Los rayos de esta imagen intermedia vuelven a ser enfocados por otro campo magnético que actúa como ocular de proyección y origina, sobre la pantalla fluoroscópica o la placa fotográfica, la imagen definitiva que es real aumentada y derecha respecto del objeto.

Todo el dispositivo está rodeado por una cubierta metálica hermética y en su interior debe existir un vacío extremo.

Los preparados deben ser sumamente delgados aproximadamente 0,5 milimicras, para ello se emplean sales de metales pesados (plomo osmio, paladio) este proceso se llama sombreado que da aspecto de relieve.

## EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

La morfología de los microorganismos puede examinarse de dos formas: observando microorganismos vivos sin colorear (en fresco) y observando células no viables teñidas con colorantes. El examen en fresco no solo permite observar microorganismos, sino que podemos observar células sanguíneas que orientan al diagnóstico o a la correcta recolección de la muestra.

Toda muestra que ingresa al laboratorio de Microbiología debe examinarse en forma: macro y microscópica, para evaluar su calidad y adecuar los procedimientos a seguir.

## EXAMEN MACROSCÓPICO

Consiste en obtener información a simple vista en cuanto a la naturaleza y calidad de la muestra en cuestión teniendo en cuenta para ello lo siguiente:

- 1) Tipo de recipiente.
- 2) Cantidad de material.
- 3) Aspecto (límpido, turbio, etc.).
- 4) Presencia de olor.
- 5) Apariencia purulenta.
- 6) Presencia de gas.

Todo esto puede darnos valiosas pistas en cuanto a la naturaleza y calidad de las muestras en cuestión.

## EXAMEN MICROSCÓPICO

Se realiza mediante el empleo de técnicas e instrumentos específicos.

La observación al microscopio óptico de bacterias, hongos, levaduras, puede orientar hacia la posible fuente de contaminación, o a la detección de algún error concreto en un punto dado del procesamiento industrial (ej. temperatura).

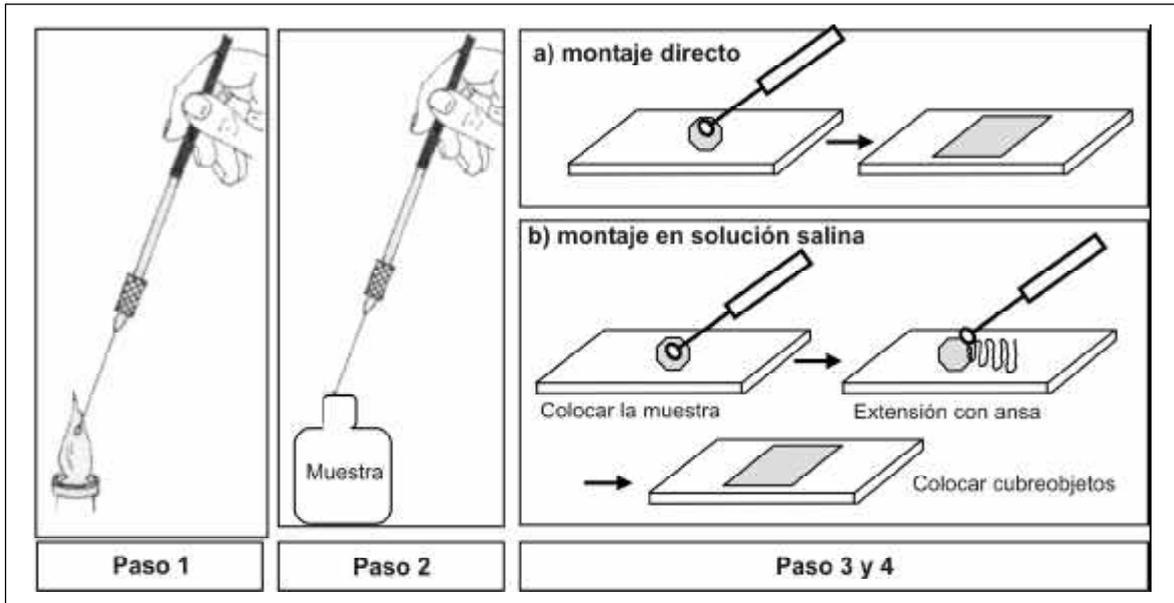
Existen distintas técnicas que nos permiten observar ciertos microorganismos:

### • Montaje Directo

Si la muestra a observar es líquida, ej. orina, solución fisiológica turbia, jarabe, etc., se toma una pequeña porción de la muestra con el ansa ojal estéril y se coloca entre porta y cubreobjetos (Fig. 2.4a). Para evitar la formación de burbujas, el cubreobjetos debe colocarse inclinado y una vez que el líquido se extienda en su borde, se deja caer lentamente. Se realiza la observación en microscopio óptico a 10x o 40x.

### • Montaje en solución salina

Sobre un portaobjetos se suspende una gota de solución salina y una pequeña cantidad de muestra (Fig. 2.4b). Con un ansa, se realiza la extensión de la muestra en la gota de líquido. Se coloca un cubreobjetos y luego de esperar un tiempo para sellar con esmalte de uñas. Para evitar desecación, puede rodearse con VasPar (mezcla de Vaselina y Parafina). Se observa en 10x o en 40x.



**Figura 2.4:** Montaje húmedo entre portaobjetos y cubreobjetos: 1) Esterilizar el asa en la llama del mechero, 2) Tomar la muestra con el asa estéril y enfriada, 3) a. Muestra líquida: montaje directo, b. muestra sólida o pastosa: montaje en solución salina, 4) Colocación del cubreobjetos, la muestra se extiende con el peso del cubreobjetos.

**• Técnica de la gota pendiente**

Se realiza en portaobjetos excavados. Generalmente se utiliza para observar movilidad de los microorganismos. Hay menor distorsión por el peso del cubre, primero se observa en 10X buscando el borde de la gota, una vez colocado se pasa a 40X. Se utiliza condensador bajo para producir una iluminación moderada.

**• Montaje en Hidróxido de Potasio**

Se emplea una solución de Hidróxido de potasio al 10 % para lograr la apertura de las células escamosas de piel, pelo y uña. Ayuda a detectar elementos fúngicos en muestras que contienen queratina. El KOH disuelve la queratina de fondo desenmascarando los elementos fúngicos hasta hacerlos más visibles (Fig. 2.5).



**Figura 2.5.** Hifas en muestras de piel.

**• Montaje en Iodo**

Se utiliza solución de Lugol (Ioduro de potasio – Yodo), para observar materias fecales, se visualizan más fácilmente protozoos, huevos y larvas de helmintos. El Iodo tiñe núcleos y organelas citoplasmáticas (Fig. 2.6).

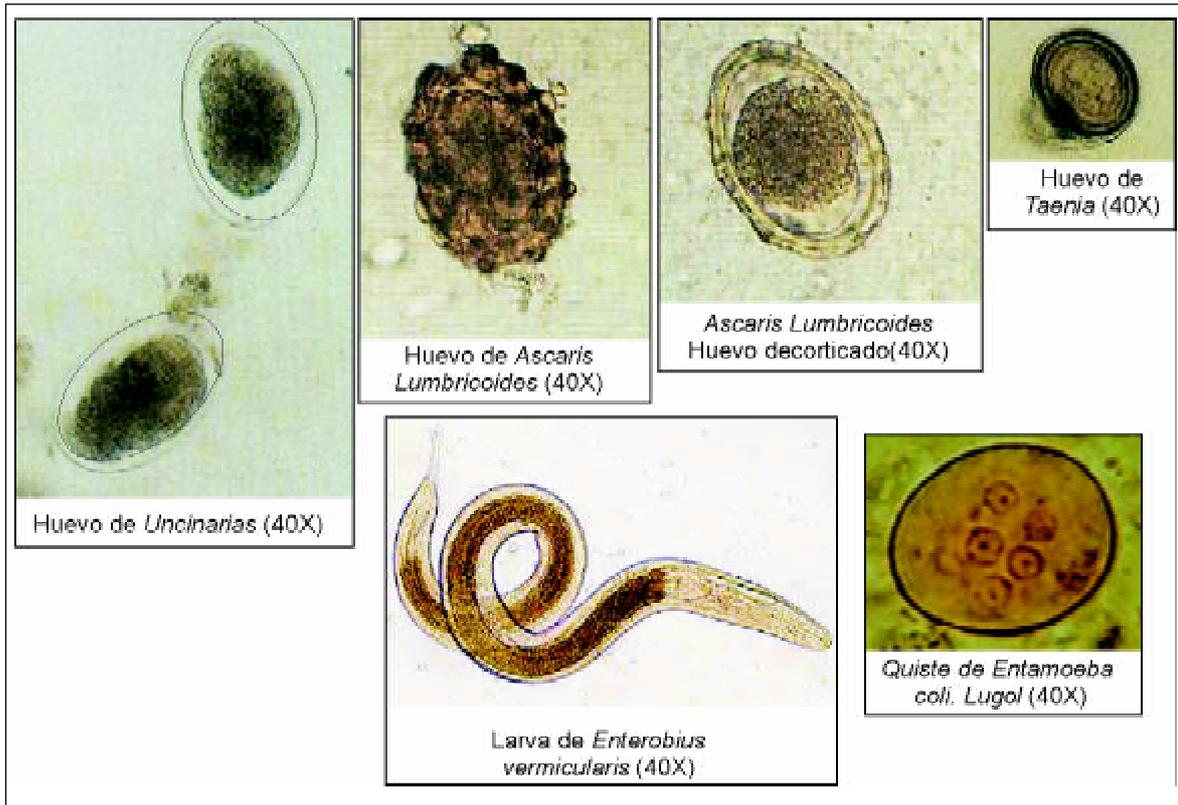


Figura 2.6. Huevos, larvas y quistes de parásitos de importancia en Parasitosis humanas.

• **Técnica de la Tinta China**

Se emplea para visualizar cápsulas de algunos microorganismos como la levadura *Cryptococcus neoformans* en Líquido cefalorraquídeo. La tinta china da un fondo semiopaco contra el cual se ven las cápsulas claras y brillantes.

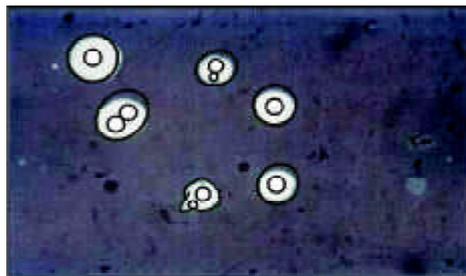


Figura 2.7. Cápsulas de *Cryptococcus* en tinta china.

• **Técnica de la Cinta adhesiva**

Se emplea para la visualización microscópica de estructuras fúngicas. Sobre un portaobjetos colocamos una gota de agua destilada. Retiramos un trozo de 2-3 cm. de cinta adhesiva y lo colocamos sobre el hongo desarrollado en placa de Petri. Las estructuras fúngicas se “pegan” a la cinta, la cual se coloca sobre la gota del portaobjetos y se observa al M.O. a 10X y 40X (Fig. 2.8).

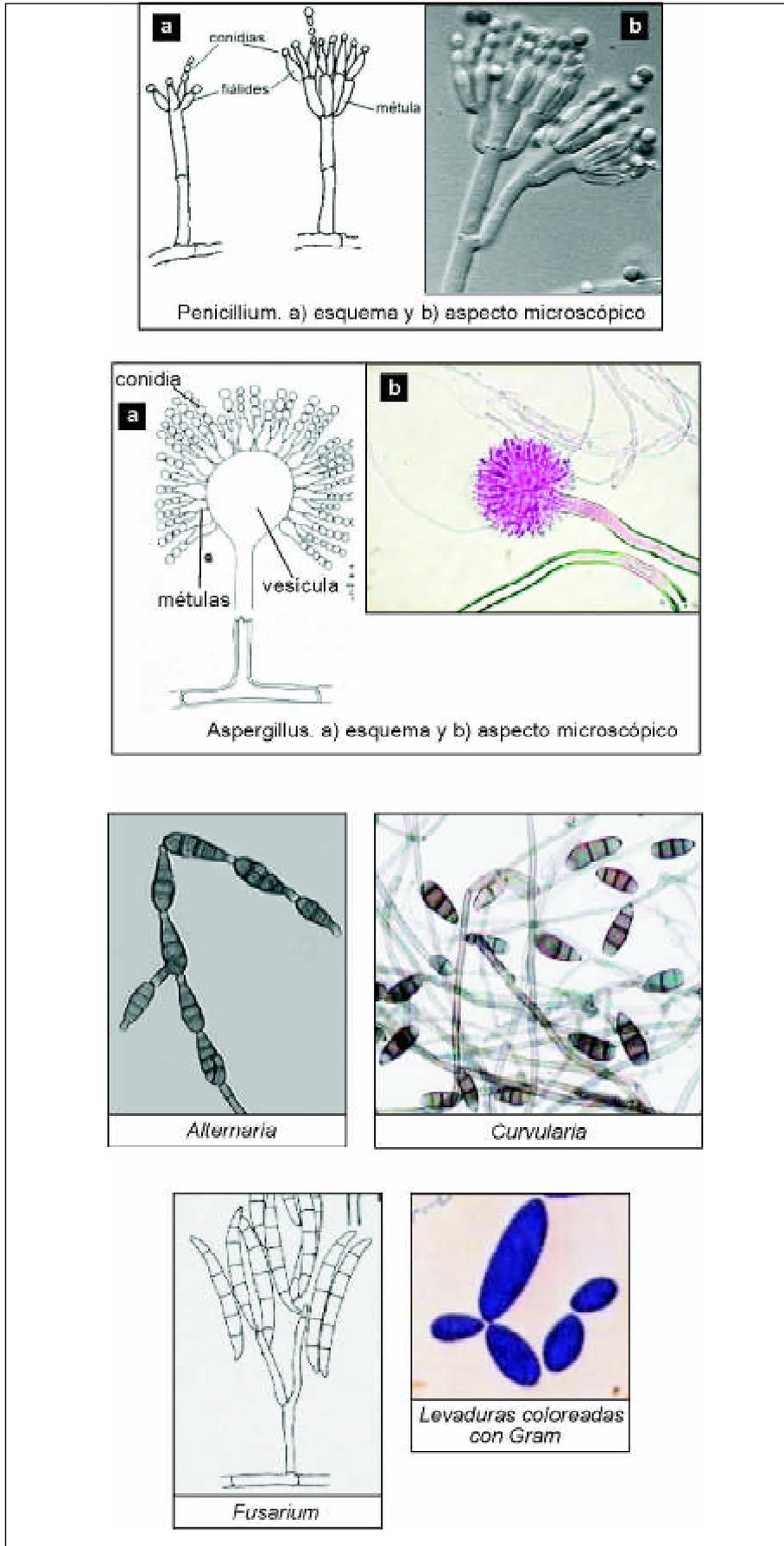


Figura 2.8. Estructuras fúngicas observadas con la técnica de la Cinta adhesiva.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 2

Los alumnos deberán realizar el examen macro y microscópico de las muestras asignadas por el docente, realizando los procedimientos apropiados para completar un informe detallado acerca de la muestra en cuestión.

### EXAMEN MACROSCÓPICO

Se dispondrá de diversas muestras para realizar la observación y descripción macroscópica y la valoración en cuanto a naturaleza y calidad de la muestra.

Registrar datos tales como: cantidad, olor, color, aspecto, consistencia, presencia de gas, gránulos, sedimento macroscópico, pH, etc.

### EXAMEN MICROSCÓPICO. Observación en fresco

**Montaje Directo.** Si es un medio líquido, depositar una gota con el ansa sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos. Observar al microscopio en 10x y 40x.

**Montaje en solución salina.** Si la muestra es de naturaleza sólida, previamente deberá colocar una gota de agua sobre el porta utilizando el ansa, luego extender la muestra y luego seguir el mismo procedimiento que 1).

**Montaje en Yodo.** Las muestras de materia fecal se colocarán en una gota de Lugol sobre un portaobjetos. Se coloca el cubreobjetos y se realizará la observación microscópica a 10x y 40x.

**Montaje en Hidróxido de Potasio.** Las costras de piel, uña o pelo se montarán sobre una gota de hidróxido de potasio al 10%. Colocar un cubreobjetos y dejar asentar a temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos. El preparado se puede calentar suavemente en la llama de un mechero para acelerar el proceso de aclaración. No permitir que hierva. Observar en microscopio óptico a 10x y 40x.

**Técnica de la Tinta china.** Emulsionar sobre un portaobjetos una pequeña cantidad de la muestra en una gota de tinta china y colocar un cubreobjetos. La emulsión de contraste no debe ser muy espesa, ya que puede bloquear totalmente la luz transmitida.

**Técnica de la Cinta adhesiva.** Colocar un trozo de cinta adhesiva de 6 cm de longitud, por el lado adhesivo, sobre el borde de una colonia fúngica joven. Retirar y extender sobre un portaobjetos que contenga una gota de Lactofenol, azul de algodón. Observar inmediatamente al microscopio dado que luego de 10 o 15 minutos la cinta se opaca y dificulta la visualización de los elementos fúngicos.



## TRABAJO PRÁCTICO 3

### TINCIÓN DE MICROORGANISMOS

#### OBJETIVOS

- *Conocer diferentes metodologías de Tinción para la visualización microbiana.*
- *Adquirir entrenamiento en los diversos procedimientos de tinción.*
- *Realizar la observación microscópica de células procariotas y eucariotas coloreados con diversas tinciones.*
- *Valorar la importancia del empleo de coloraciones apropiadas en el estudio morfológico: tamaño, forma y agrupación de las células y en la identidad de microorganismos.*
- *Valorar la utilidad de la Coloración de Gram y Ziehl Neelsen en el análisis sistemático de muestras clínicas para el diagnóstico de infecciones bacterianas.*

### INTRODUCCIÓN

Debido a que las bacterias y otros microorganismos son pequeños y el índice de refracción de su protoplasma es muy cercano al del agua, es necesario efectuar coloraciones para visualizarlos adecuadamente.

La mayoría de los colorantes usados en microbiología son derivados de la anilina, y están compuestos por uno o más anillos bencénicos conectados por uniones químicas asociadas a la producción de color, constituyendo grupos cromóforos y la intensidad de un colorante es proporcional al número de radicales cromóforos del compuesto. Los cromóforos más comúnmente hallados en los colorantes son:



A los colorantes se los designa como ácidos o básicos. Esto no nos indica necesariamente sus reacciones de pH en solución, sino más bien si una parte de la molécula es aniónica o catiónica.

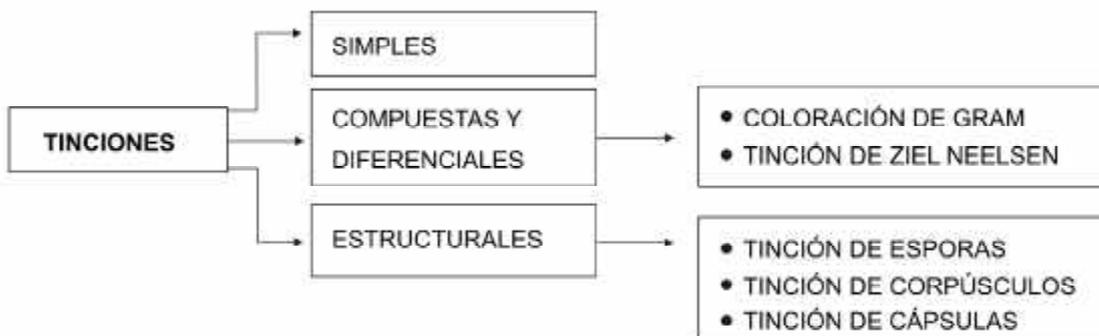
**Colorante básico:** muchos de los colorantes comúnmente usados están cargados positivamente (catiónicos) y se combinan fuertemente con los constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Como ejemplo de los colorantes catiónicos tenemos: azul de metileno, cristal violeta y safranina.

**Colorante ácido:** otros como eosina, fucsina ácida y rojo congo están cargados negativamente (aniónicos) y se combinan con constituyentes celulares cargados positivamente, como numerosas proteínas.

### TIPOS DE TINCIIONES

Son numerosas las coloraciones utilizadas para individualizar al microscopio los diferentes microorganismos.

Se mencionan de fundamental importancia por su amplio uso las coloraciones de GRAM y ZIEHL NEELSEN, pero existen otras, por lo que es conveniente dividir las en simples, compuestas y estructurales.



**1.-Tinción simple:** aquella en la que solo se utiliza un colorante, que generalmente tiñe a los microorganismos. Este tipo de tinción se denomina directa.

Si el colorante proporciona una coloración al fondo, sin alterar el aspecto de las células que permanecen sin teñir, la tinción se denomina negativa.

La tinción simple permite observar morfología celular, tamaño y agrupación de los microorganismos.

**2.-Tinción diferencial:** es aquella que emplea secuencialmente dos colorantes que permiten distinguir tipos de microorganismos en función de diferencias en su estructura y composición química.

La tinción de Gram y la ácido-alcohol-resistente, basadas en las propiedades de la pared celular bacteriana, son las más utilizadas.

**3.-Tinción estructural:** se utiliza para identificar y estudiar determinadas estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos. En las tinciones estructurales se colorea únicamente una parte de la célula.

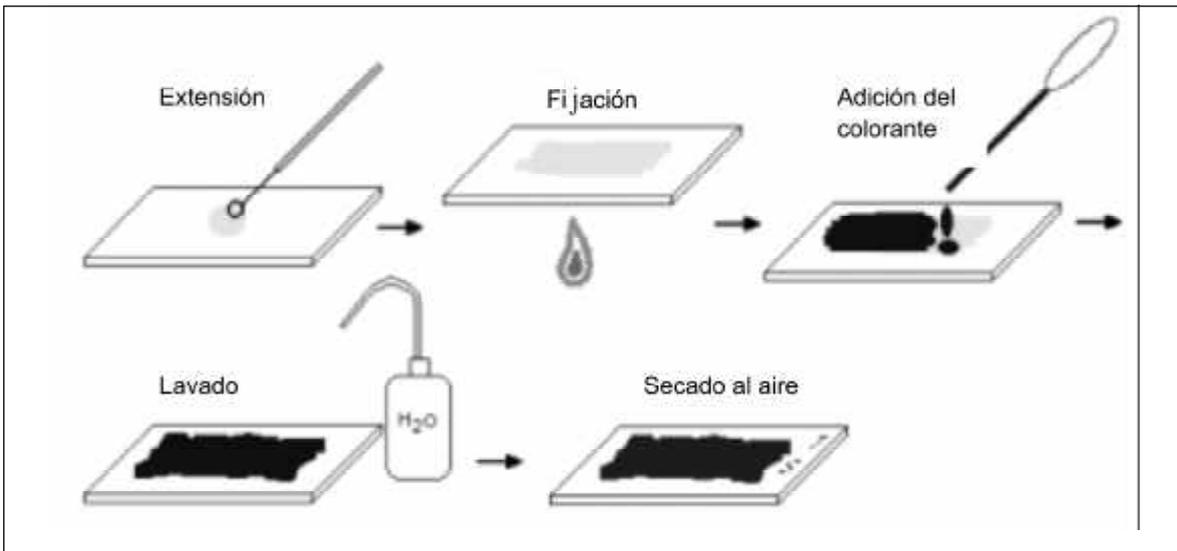
Se utiliza este tipo de tinciones para poner en evidencia la presencia de cápsulas, endosporas, flagelos o inclusiones (almidón, polifosfato, etc.).

#### TÉCNICA GENERAL DE TINCIONES

En todas las tinciones deben seguirse los mismos primeros pasos, como a continuación se detalla y que se muestran en la figura 3.1:

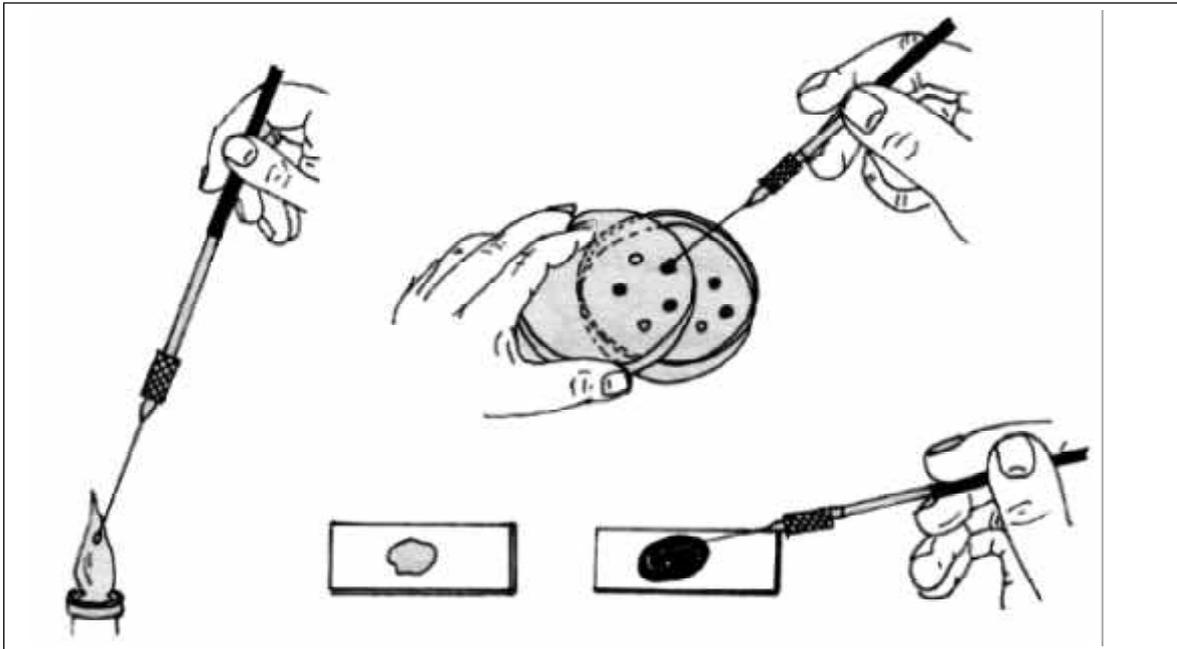
Pasos generales de una tinción:

1. Extensión.
2. Fijado.
3. Adición de colorantes.
4. Lavado.
5. Secado.
6. Observación microscópica.



**Figura 3.1.** Procedimiento general para realizar una tinción.

1- Realizar una extensión con el asa de siembra esterilizada; para ello se toma una pequeña gota de cada una de las muestras y/o cultivos y se extiende en un portaobjetos limpio (Fig. 3.2). Si el cultivo procede de un medio sólido se coloca una gota de agua en el portaobjetos y se mezcla con una pequeña porción de la muestra hasta formar una suspensión homogénea, extendiéndola con el fin de obtener una fina película (Fig. 3.3). Posteriormente, se deja secar al aire o en la parte alta de la llama del mechero, pero no se debe eliminar el líquido calentando el portaobjetos a la llama porque pueden distorsionarse las células.



**Figura 3.2.** Procedimiento empleado para realizar la extensión de la muestra tomada desde un cultivo bacteriano en placa de Petri.

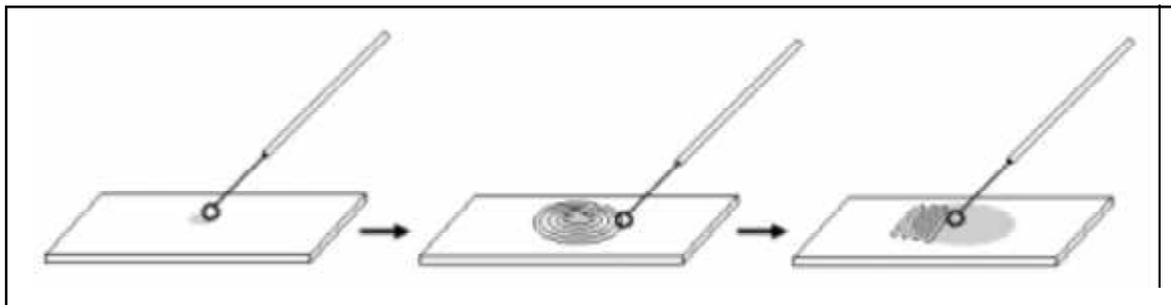


Figura 3.3. Técnica de extensión de una muestra sobre portaobjetos.

2- Fijar la muestra. La fijación tiene como finalidad coagular el protoplasma de las células y hacer que se adhieran al portaobjetos, siendo el calor el método más utilizado para la fijación, aunque pueden utilizarse otros agentes, como el alcohol (metanol) u otros compuestos químicos. La fijación con calor se recomienda cuando se trabaja con muestras de un cultivo sólido; en muestras obtenidas de un cultivo líquido es mejor hacer la fijación con metanol ya que se retiene en el portaobjetos un mayor número de células. Es necesario que la extensión se haya secado antes de proceder a la fijación, por ello se debe esperar hasta que el líquido de la misma se evapore. La fijación por calor se lleva a cabo pasando varias veces la preparación seca a través de la llama de un mechero, con la extensión hacia arriba. El calor desnaturaliza las proteínas y suele matar al microorganismo. Es importante no excederse en este proceso para evitar que las bacterias se deformen o se rompan, siendo suficiente que el portaobjetos se note caliente sobre el dorso de la mano, pero no demasiado.

3- Realizar la tinción. Para ello es necesario cubrir la preparación con abundante colorante y dejarlo actuar durante algún tiempo.

4- Pasado ese tiempo, lavar con agua las preparaciones teñidas para eliminar el exceso de colorante, dejando caer con suavidad el agua sobre un extremo del portaobjetos, que se mantendrá inclinado durante este proceso. No se debe dirigir el agua con demasiada fuerza sobre la preparación para no arrastrar la muestra.

5- Eliminar el exceso de agua del portaobjetos golpeándolo ligeramente con cuidado por el canto. Permitir que se seque la preparación, bien utilizando un papel secante, sin frotar, o bien dejándola secar al aire, aunque lleva más tiempo. Se puede dejar secar acercando el preparado teñido por encima de la llama del mechero a unos 20 cm de la llama para evitar el sobrecalentamiento de la muestra teñida que podría crear artificios indeseados.

6- Examinar la preparación al microscopio con el objetivo de inmersión (100x), colocando, previamente una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.

## TINCIÓN SIMPLE

Cuando solo se emplea un colorante para teñir una muestra el procedimiento recibe el nombre de coloración simple o tinción simple. Esta permite apreciar en forma rápida la morfología microbiana, ej.: células epiteliales, leucocitos, etc. Generalmente se usa el Azul de Metileno, que se puede utilizar directamente en solución acuosa, pero tiene el inconveniente de su comportamiento irregular, por lo que se aconseja la siguiente fórmula, entre otras:

Azul de Metileno.....0,3 g  
Alcohol de 95%.....30 ml  
Agua destilada.....100 ml

También pueden emplearse otros colorantes de uso habitual en el laboratorio como la fucsina o el cristal violeta.

Realizar la tinción cubriendo la preparación con abundante colorante y dejarlo actuar durante algún tiempo. Para la fucsina fenicada bastan de 15 a 30 segundos, para el cristal violeta es suficiente de 30 a 45 segundos y para el azul de metileno de 3 a 5 minutos.

## TINCIÓN NEGATIVA

Permite conocer el tamaño y la morfología de los microorganismos, realizando una coloración del fondo, sin que se colorean las bacterias o las estructuras que se tratan de observar. Existen dos tinciones negativas: 1) **Tinción con Tinta china**; y 2) **Tinción con Nigrosina**.

### Tinción con Nigrosina

- Depositar una gota de la suspensión de microorganismos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) con un ansa de siembra esterilizada, sobre un portaobjetos.
- Añadir una gota de solución de Nigrosina al 10%.
- Mezclar totalmente y dejar secar al aire.
- Hacer una extensión en otro portaobjetos mezclando una cierta cantidad de sarro dentario, (extraído recientemente con un palillo estéril), con una gota de solución de Nigrosina, hasta conseguir una suspensión homogénea. A continuación secar al aire.
- Examinar las dos preparaciones con el objetivo de inmersión. Los microorganismos aparecerán sin teñir, en contraste con el fondo oscuro, pudiéndose apreciar su tamaño, forma y agrupación características.

## TINCIONES COMPUESTAS Y DIFERENCIALES

Cuando se emplea más de un colorante para teñir una muestra el procedimiento recibe el nombre de tinción compuesta y debido a que no tiñen de la misma manera a todos los componentes celulares se denominan diferenciales. Los colorantes que se utilizan reaccionan de modo diferente con los distintos microorganismos, generalmente debido a diferencias en la estructura y/o composición química de la pared celular de estos.

Como ya se ha mencionado, las más utilizadas son las de Gram, que nos permiten dividir a los gérmenes en dos grandes grupos: Gram Positivos y Gram Negativos, según tomen o no el colorante básico: Cristal Violeta o Violeta de Genciana, y la de Ziehl Neelsen que colorea los bacilos ácido-alcohol resistentes como el agente etiológico de la Tuberculosis y la Lepra.

## COLORACIÓN DE GRAM

Se usan dos colorantes, Cristal Violeta (colorante primario) y Safranina (de contraste). Se realiza en cuatro etapas, las que se describen detalladamente en el *desarrollo práctico* de esta guía.

Al aplicar el colorante primario, y mordiente, todas las bacterias se tiñen de color violeta, debido a la formación del complejo cristal-I.

El paso más delicado de la coloración constituye la decoloración (3<sup>er</sup> paso), donde las células Gram positivas retienen al complejo Cristal Violeta-Iodo, y las Gram negativas se decoloran completamente. Es así que al aplicar el colorante de contraste (Fucsina), las células Gram negativas se tiñen de color rosado.

El fundamento de la reacción diferencial de Gram se basa en la estructura de la pared de las células bacterianas (Fig. 3.4) La pared Gram positiva presenta una barrera de permeabilidad frente a la elusión del complejo colorante-Iodo por parte del alcohol. Este mecanismo explica la clásica observación de que las bacterias Gram (+) a menudo se vuelven Gram (-) cuando envejece el cultivo, porque ciertas enzimas autocatalíticas atacan la pared celular. Aparentemente, en las Gram (+) el alcohol deshidrata y ocasiona disminución de la permeabilidad. Las células Gram (-), con mayor contenido lipídico que las Gram (+), presentan un aumento de permeabilidad a la salida del complejo colorante-I, (además, el alcohol extrae lípidos).

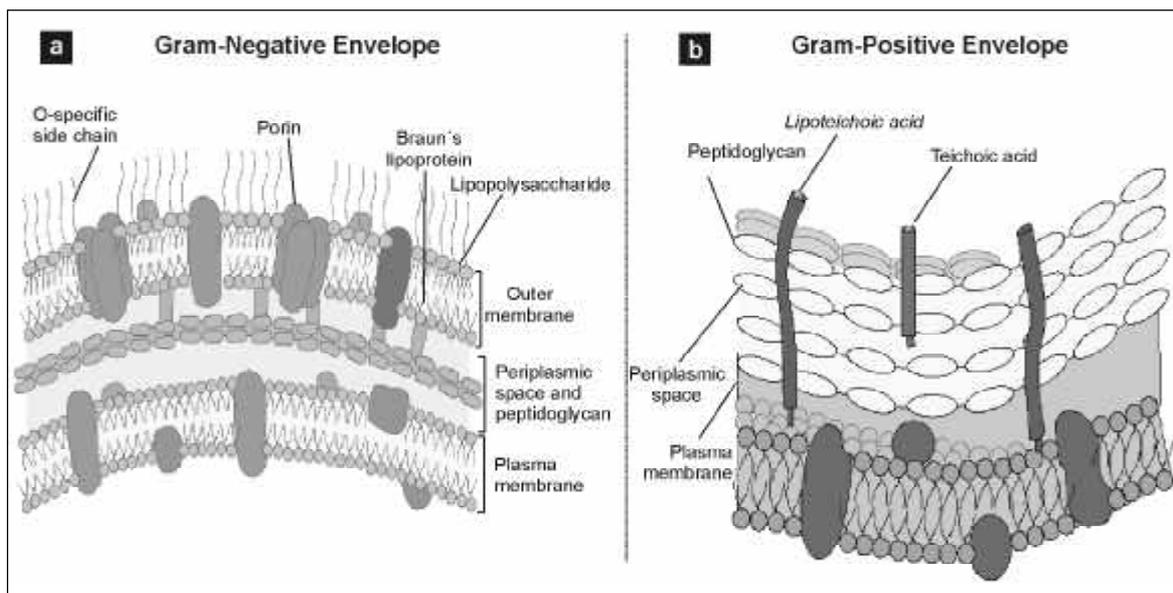


Figura 3.4. Estructura de la pared de Bacterias a) Gram (-), b) Gram (+).

**TINCIÓN ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE DE ZIEHL NEELSEN**

Las micobacterias poseen una pared gruesa y serosa (Fig 3.5) resistente a la tinción y una vez teñida resiste a la decoloración al ser tratada con solventes orgánicos tales como el alcohol ácido (EtOH al 95% y HCl al 3%), por eso se llaman acidorresistentes.

Para que el colorante primario, la carbolfucsina, penetre a través de la pared celular serosa de los bacilos ácido-alcohol resistentes, se requiere un tratamiento físico más violento, que puede ser:

a) **CALOR**, que se usa en la técnica convencional de Ziehl Neelsen: luego de cubrir con la carbolfucsina se pasa una llama por debajo del extendido, hasta observar desprendimiento de vapores blancos de la solución colorante.

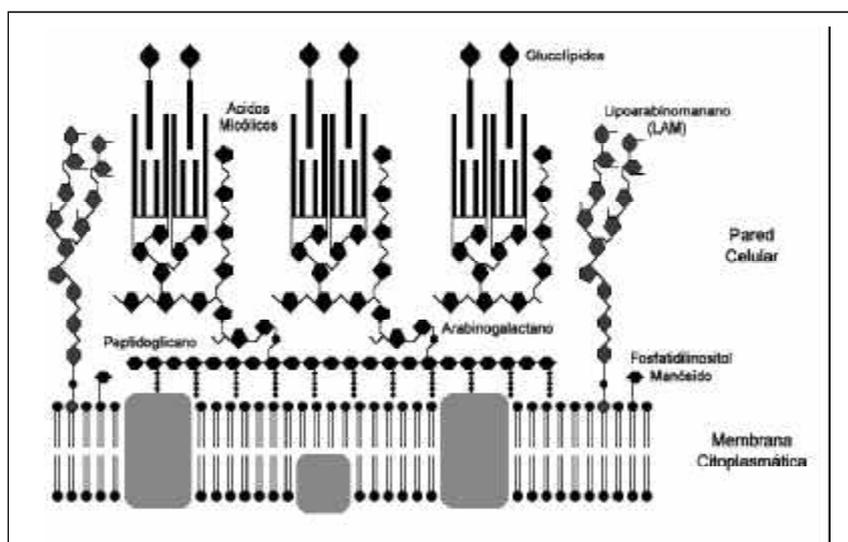


Figura 3.5: Estructura de la pared de Bacterias Ácido-Alcohol Resistente.

b) **UN AGENTE TENSIOACTIVO** (tergitol). En este caso se añade al colorante. Esta técnica en frío es la modificación de Kinyou. El colorante triaminotrifetilmetano (carbolfucsina), se combina con el ácido micólico de la pared celular micobacteriana.

La característica más sorprendente de las micobacterias (químicamente hablando) es su contenido en lípidos (entre un 20 y un 40% de su peso seco). La pared tiene un 60% de su peso seco constituido por lípidos.

Esto explicaría las propiedades de las micobacterias como impermeabilidad a los colorantes, ácidorresistencia, resistencia a la acción letal de ácidos y álcalis, o a la acción bactericida de anticuerpos. Entre los lípidos que se extraen con solventes orgánicos están las ceras y los glucolípidos. Se encuentran distintos ácidos grasos en los lípidos de las micobacterias, pero el más importante es el ácido micólico ya que solo se encuentra en estos microorganismos. Se observan con Objetivo de inmersión (ver Técnica).

## MORDIENTES Y DECOLORANTES

Los agentes físicos y químicos que fijan el colorante o le permiten penetrar más profundamente en el microorganismo se llaman **mordientes**.

El aceite de anilina, fenol, sales metálicas, son algunos ejemplos de agentes químicos usados en distintos métodos de coloración. Entre los agentes físicos tenemos el calor.

Una vez que el microorganismo ha sido teñido intensamente y el colorante se ha fijado por acción del mordiente, no es fácil eliminarlo. Sin embargo, las bacterias varían en su comportamiento a este respecto, lo que hace posible las coloraciones diferenciales como ya se mencionara.

El colorante se elimina de ciertas bacterias mediante **decolorantes**, tales como alcoholes diluidos, acetona, éter, ácidos orgánicos, etc., con la posterior coloración con un colorante de contraste.



## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 3

Coloraciones: Técnicas de uso corriente (Azul de Metileno, Gram, Ziehl Neelsen, Giemsa).  
Observación Microscópica: Morfología microbiana (bacterias, hongos, etc.).

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL A TEÑIR

1. Tomar un portaobjetos limpio y desengrasado e identificarlo usando lápiz demográfico o marcador indeleble.
2. Realizar un extendido colocando sobre el portaobjetos una gota de agua o solución fisiológica.
3. Frente al mechero abrir la placa (o tubo) y con el ansa de anillo, esterilizado a la llama y enfriado, tocar una colonia y cerrar inmediatamente la placa.
4. Realizar una suspensión del material cargado con el ansa por rotación sobre la gota de agua o solución fisiológica (Fig. 3.1 y 3.2).
5. Dejar secar “al aire” cerca del mechero.
6. Cuando el extendido esté seco (se torna opaco) pasarlo tres veces por el interior de la llama para fijarlo al vidrio.
7. Una vez fijado el extendido, colorear con la técnica de Gram para la observación microscópica.

### COLORACIÓN DE LOS EXTENDIDOS

#### A) COLORACIÓN DE GRAM:

##### 1. Materiales:

Portaobjetos.  
Ansas.  
Mecheros.  
Hisopos.  
Microscopio.  
Aceite de Inmersión.  
Cultivos bacterianos y de levaduras.  
Muestras.  
Campana.  
Bandeja para coloraciones.  
Pipetas.

##### 2. Colorantes:

#### CRISTAL VIOLETA OXALATADO (MODIFICACIÓN DE HUCKER)

##### Solución A:

Cristal violeta	10 g
Etanol de 95%	100 ml

##### Solución B:

Oxalato amónico	1 g
Agua destilada, c.s.p.	1000 ml

Mezclar 20 ml de la solución A y 80 ml de la solución B. Guardar durante 24 horas y filtrar a través de papel de filtro.

**SAFRANINA**

Safranina O	0,25 g
Etanol de 95%	10 ml
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Disolver la safranina en el etanol y añadir entonces el agua destilada.

**LUGOL**

Iodo metálico	1 g
Ioduro de Potasio	2 g
Agua destilada	300 ml

**ALCOHOL ACETONA**

Etanol 95°	70 ml
Acetona	30 ml

**3. A) Técnica de Coloración:**

- Colocar el extendido sobre la cubeta de coloraciones.
- Cubrir el preparado con Violeta de Genciana. Dejar actuar 1 minuto. Volcar y lavar con agua de canilla.
- Cubrir con Lugol. Dejar actuar 2 a 3 minutos.
- Volcar y lavar con agua de canilla.
- Con el portaobjetos inclinado dejar caer sobre el extendido gota a gota el decolorante alcohol acetona hasta que no se arrastre más colorante.
- Lavar con agua de canilla.
- Cubrir con fucsina básica diluida al décimo. Dejar actuar 30 segundos.
- Lavar con agua. Secar el preparado dejándolo cerca del mechero o comprimiéndolo sin frotar entre dos hojas de papel de filtro.
- Observar al Microscopio con Objetivo de inmersión (100 x).
- Las bacterias Grampositivas se verán azules y las Gramnegativas rojas o fucsia. Dibujar.

Paso de la Tinción	Producto que se emplea	Reacción y coloración de las bacterias	
		GRAM (+)	GRAM (-)
Colorante básico o primario	Cristal violeta (CV)	Bacterias color violeta	Bacterias color violeta
Mordiente	LUGOL (solución yodada)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se forma el complejo CV-Yodo.</li> <li>● Las bacterias continúan teñidas de violeta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se forma el complejo CV-Yodo.</li> <li>● Las bacterias continúan teñidas de violeta.</li> </ul>
Decoloración	Alcohol Acetona	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se deshidratan las paredes celulares.</li> <li>● Se contraen los poros.</li> <li>● Disminuye la permeabilidad.</li> <li>● El complejo CV-I no sale de las células que continúan teñidas de color violeta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Eliminación por extracción de las grasas de las paredes celulares.</li> <li>● Aumenta la porosidad</li> <li>● El complejo CV-I se separa de la célula.</li> </ul>
Contraste	Fucsina básica o Safranina	Células no decoloradas, quedan teñidas de color violeta del colorante básico o primario.	Células decoloradas, se tiñen de color rosado con el colorante de contraste o secundario.

**Posibles errores de la Coloración de Gram:**

- Fijar el frotis a la llama cuando el preparado todavía está húmedo.
- Extendidos muy gruesos.
- Precipitación de la solución del Cristal Violeta (hay que filtrarla o preparar una nueva).
- El Lugol no actuó el tiempo suficiente o estaba muy diluido.
- El lavado insuficiente con agua en cualquiera de las etapas.
- El lavado con alcohol –acetona:
  - a) excesivo: se ven todas las bacterias como Gram (-).
  - b) escaso: se ven todas las bacterias como Gram (-).
- Una coloración en exceso con la fucsina o safranina.

**B) COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN:**

1) **Materiales:** Idem que para coloración de Gram.

2) **Colorantes**

**FUCSINA FENICADA**

Fucsina básica	0,3 g
Fenol	5 ml
Etanol de 95%	10 ml
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

**ALCOHOL ACIDO (DECOLORANTE)**

Alcohol	485ml
Ácido Clorhídrico puro	15ml

**AZUL DE METILENO**

Azul de Metileno	3g
Agua destilada	1000ml

**3. B) Técnica de Coloración**

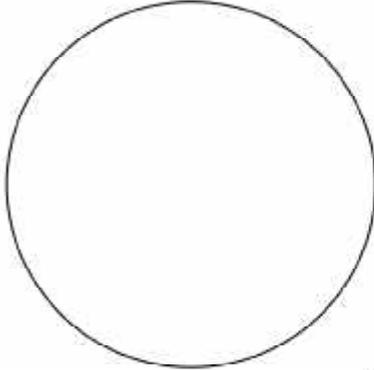
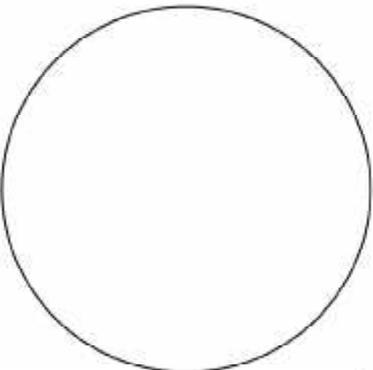
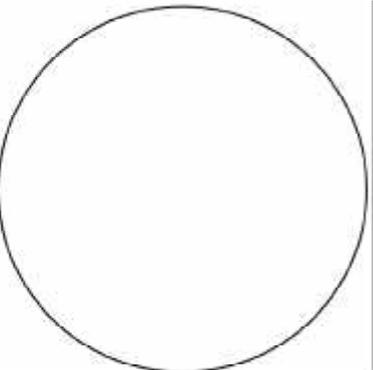
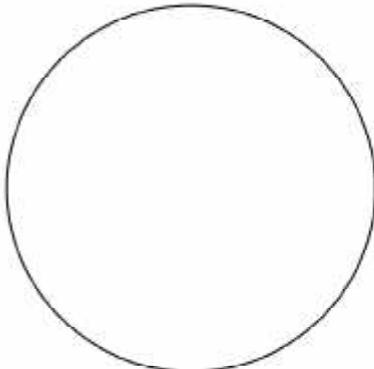
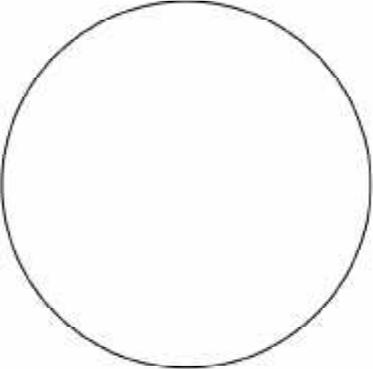
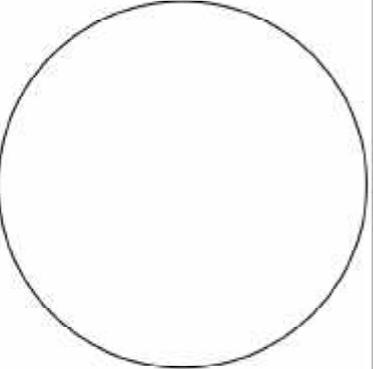
- a) Con las precauciones dadas por el instructor, siempre frente al mechero, tomar un portaobjetos seco, limpio y desengrasado, sin rayaduras, y depositar sobre él una gota de agua con el ansa y del cultivo con BAAR, sacar una colonia y depositarla sobre el portaobjetos, quemar el ansa (¡CUIDADO!), luego secar y fijar a la llama el preparado realizado.
- b) Poner el portaobjetos sobre la bandeja para coloraciones, agregar la Fucsina fenicada, que cubra todo el preparado, y con un hisopo embebido en alcohol encender y pasar por debajo del portaobjetos, hasta desprendimiento de vapores blancos.
- c) Cuando no se observen más desprendimientos de los mismos, dejar un minuto y volver a calentar. Repetir el procedimiento tres veces con la precaución de no secar el preparado.
- d) Cubrir con el decolorante alcohol-ácido. Dejar actuar hasta neta coloración roja. Volcar. Repetir el procedimiento hasta que solo aparezca una coloración rosada muy tenue. Lavar con agua.
- e) Cubrir con una solución de contraste, azul de metileno, durante un minuto. Lavar con agua. Dejar secar al aire.
- f) Observar al microscopio. Las bacterias ácido-alcohol resistentes se verán rojas sobre un fondo azul. Dibujar.

Paso de la Tinción	Producto que se emplea	Reacción y coloración de las bacterias	
		Bacterias ácido alcohol resistentes	Otras bacterias
Colorante básico	Fucsina Fenicada	Se tiñe de rojo	Se tiñen de rojo
Mordiente	Calor	Permanecen rojas	Permanecen rojas
Decoloración	Alcohol Ácido	Permanecen rojas	Se decoloran
Contraste	Azul de metileno	Permanecen rojas	Se tiñen de azul

**OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE FROTIS COLOREADOS**

1. Colocar el portaobjetos con el preparado hacia arriba (es el lado más opaco) sobre la platina.
2. Enfocar con objetivo seco de 40X moviendo el tornillo macrométrico.
3. Girar el revolver del microscopio sin mover la platina y colocar sobre el preparado una gota de aceite de inmersión.
4. Enfocar con el objetivo de inmersión de 100X hasta lograr nitidez moviendo el tornillo micrométrico.
5. Registrar en el sitio correspondiente a la coloración de Gram la morfología y tinción de la bacteria.

**ESQUEMATIZACIÓN DE LAS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS**

		
Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____	Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____	Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____
		
Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____	Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____	Muestra: _____ Tinción: _____ Morfología _____ Aumento: _____

## TRABAJO PRÁCTICO 4

### MEDIOS DE CULTIVO

#### OBJETIVOS

- *Adquirir destreza en la preparación, acondicionamiento, esterilización y almacenamiento de distintos tipos de medios de cultivo.*
- *Interpretar, según los componentes, la finalidad metabólica de los mismos.*

### INTRODUCCIÓN

Los microorganismos deben tomar del medio todas las sustancias necesarias para obtener energía y para sintetizar los materiales necesarios, incluyendo las unidades requeridas para construir las moléculas estructurales. Estas sustancias se denominan nutrientes.

De esta forma, obtienen energía y poder reductor del medio ambiente a través de una serie de procesos metabólicos (catabolismo). Esta energía y poder reductor conservadas momentáneamente en transportadores especiales (ATP, NADH/NADPH) es usada en otra serie de procesos metabólicos (anabolismo) para biosintetizar todas las moléculas necesarias para la vida.

### FERMENTACIÓN

Es un proceso metabólico productor de energía, con las siguientes características:

Comprende una reacción de oxidorreducción, donde tanto el dador como el aceptor de electrones son compuestos orgánicos (tanto el dador como el aceptor son dos metabolitos diferentes derivados generalmente del mismo sustrato fermentable).

No existe una oxidación neta de las sustancias orgánicas. Hay por tanto una limitación en las sustancias que pueden ser fermentadas. No pueden ser ni muy oxidadas ni muy reducidas, ej. hexosas, pentosas, polialcoholes, aminoácidos, purinas, etc.

La producción de ATP se realiza por fosforilación a nivel de sustrato, luego, el rendimiento de producción de ATP es menor que en un proceso respiratorio.

No requiere la presencia de O<sub>2</sub>, pueden ocurrir en anaerobiosis.

Se genera poder reductor en la forma de NADH.

### RESPIRACIÓN

Es un proceso metabólico productor de energía, con las siguientes características:

Comprende una reacción de oxidorreducción donde el dador de electrones es un compuesto orgánico o inorgánico reducido, y el aceptor: Oxígeno, Nitrógeno, Sulfato, Carbonato o Fumarato.

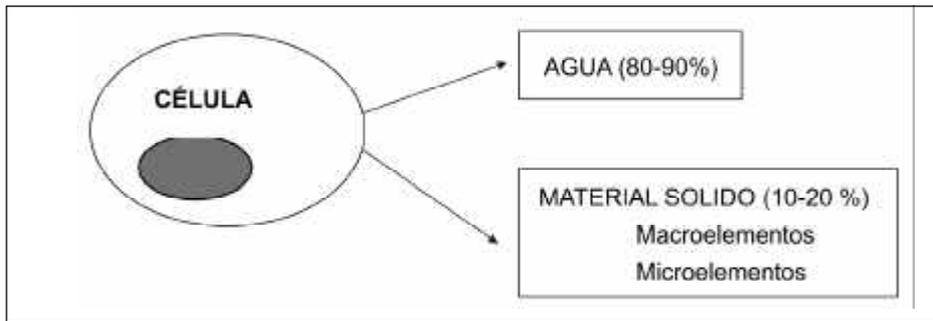
Cuando es O<sub>2</sub>, se habla de respiración aeróbica. En los otros casos, anaeróbica.

Existe una oxidación completa del sustrato, generalmente esto amplía mucho la cantidad de sustancias que pueden ser usadas como sustrato, a diferencia de la fermentación.

La producción de ATP se realiza por fosforilación a nivel del sustrato, y por fosforilación acoplada al flujo de electrones a través de una cadena de transporte (fosforilación oxidativa).

### COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS BACTERIAS

Dado que la composición química de cualquier célula es analíticamente semejante, los elementos químicos que necesitan todos los organismos vivos son esencialmente los mismos.



**PRINCIPALES MACROELEMENTOS COMPONENTES DE LAS CÉLULAS**

MACROELEMENTO	COMPUESTOS PRINCIPALES	% RELATIVO PESO SECO	FUNCIONES FISIOLÓGICAS
Carbono	Azúcares	50	Constituyente de material orgánico
Oxígeno	Agua	20	Constituyente del agua celular. Aceptor de electrones (respiración)
Nitrógeno	Sales de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Peptonas	14	Constituyente de Proteínas
Hidrógeno	Agua	8	Agua celular. Síntesis de materiales orgánicos
Fósforo	Sal inorgánica	3	Ácidos Nucleicos, fosfolípidos, Coenzimas
Azufre	Aminoácidos Sulfatos	1	Proteínas, Coenzimas (CoA carboxilasa)
Potasio	Sal inorgánica	1	Cofactor enzimático
Sodio	Sal inorgánica	1	Medio ambiente celular
Calcio	Sal inorgánica	0.5	Cofactor enzimático
Magnesio	Sal inorgánica	0.5	Cofactor ATP (clorof.)
Cloro	Sal inorgánica	0.2	Cofactor
Hierro	Sal inorgánica	0.2	Constituyente de citocromos y otras Proteínas

**PRINCIPALES MICROELEMENTOS PRESENTES DE LAS CÉLULAS**

MICROELEMENTO	FUNCIONES FISIOLÓGICAS
Manganeso	Cofactor, a veces reemplazando al Mg, constituyente de la Vit. B <sub>12</sub>
Cobalto	Enzimas de óxido-reducción
Cobre	Constituyente inorgánico de Enzimas especiales
Zinc	Constituyente inorgánico de Enzimas especiales
Molibdeno	Constituyente inorgánico de Enzimas especiales

Algunos de los elementos esenciales, tales como Mn, Co, Ca, Mb y Zn, son necesarios para las actividades enzimáticas pero difíciles de demostrar su presencia en la célula, las que son de verdaderas trazas: “MICROELEMENTOS”.

### **ABSORCIÓN DE NUTRIENTES**

La membrana plasmática de la célula de composición lipoproteica, absorbe y guarda selectivamente algunos nutrientes y al mismo tiempo segrega y excluye otros.

La pared no constituye una barrera para la absorción de nutrientes, ya que es muy porosa y permite la entrada de los materiales, con excepción de los insolubles o particulados, Ej. Celulosa. Intervienen en los mecanismos de: absorción pasiva, o transporte activo.

La célula utiliza estos nutrientes para realizar diferentes funciones.

### **MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo proporcionan una mezcla equilibrada de todos los nutrientes requeridos en concentraciones que permitan un buen crecimiento del microorganismo para el cual ha sido diseñado; por lo tanto, no hay ningún medio de cultivo que pueda permitir el desarrollo de todas las bacterias cultivables ya que, en conjunto, presentan requerimientos nutricionales muy variables.

Debe constar de una base mineral que proporcione los electrolitos que pueden suministrarse a cualquier organismo en forma iónica y que pueden actuar como nutriente y/o favorecer la actividad enzimática.

Este medio basal puede suplementarse luego con sustancias orgánicas que actúan como fuente de energía y/o fuente de carbono, más algún factor de crecimiento requerido. Estos suplementos varían de acuerdo a las propiedades nutricionales particulares del organismo que se cultiva.

Estas condiciones no son suficientes para el adecuado desarrollo de los microorganismos, requieren además condiciones físico químicas determinadas.

#### **Temperatura**

- Psicrofilas toleran de 12 a 20°C
- Psicrotrofas toleran de 20 a 30°C
- Mesófilas toleran de 30 a 40°C
- Termófilas toleran de 40 a 75°C

#### **Condiciones osmóticas**

- Halófilas: bacterias que crecen con altas concentraciones de ClNa.
- Xerófilas: levaduras y mohos, crecen en condiciones de sequedad.
- Osmófilas: levaduras tolerantes al azúcar, crecen en medios con altas presiones osmóticas.

#### **Fase gaseosa**

- Aerobios estrictos: utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones). Ej: *Bacillus subtilis*.
- Microaerofilicos: aeróbicas, pero crecen mejor en condiciones de oxígeno ligeramente reducidas), ej. estreptococos.
- Anaerobios facultativos: pueden utilizar al oxígeno como Aceptor final de electrones, pero presentan sistemas alternativos, por los que en ausencia de oxígeno emplean una diversidad de aceptores de electrones ( $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{SO}_4^{=}$ ). Ej. *Stafilococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.
- Anaerobios obligados: requieren ausencia de oxígeno. Ej. *Clostridium perfringens*.

**pH:** se les adiciona sustancias tampón, para eliminar los cambios de pH durante el crecimiento.

### **CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo en microbiología pueden clasificarse de muchas maneras, según:

• **Estado físico**

- 1. a Líquidos.
- 1. b Sólidos y semisólidos.

• **Naturaleza**

- 2. a Naturales.
- 2. b Artificiales o Sintéticos.

• **Finalidad metabólica**

- 3. a Mínimos.
- 3. b Diferenciales.
- 3. c Enriquecidos.
- 3. d Selectivos.
- 3. e De enriquecimiento.

• **Usos**

- 4. a Medios para pruebas bioquímicas.
- 4. b Medios para recuento de bacterias.
- 4. c Medios especiales.
- 4. d Medios de transporte.
- 4. e Medios de mantenimiento.

Los microorganismos pueden desarrollarse en medios de cultivos líquidos, gelificados (sólidos o semisólidos) con una fase gaseosa que los cubra:

**1. a MEDIOS LÍQUIDOS**

Los medios de cultivos líquidos, llamados comúnmente caldos o infusiones, no contienen ningún gelificante, se utilizan en el manejo de cultivos puros, permiten el crecimiento libre de los MO, con una distribución y características que dependerán del microorganismo o de las necesidades del investigador de que el desarrollo sea estático o esté agitado permanentemente y de su relación con la fase gaseosa (oxígeno en general) u otra.

**1. b MEDIOS SÓLIDOS O SEMISÓLIDOS**

El gelificante más usado es el agar, sustancia obtenida de algas marinas y que en el medio de cultivo se comporta como inerte; también se utilizan agarosa, que tiene un grado de pureza y transparencia mayor que el agar y la gelatina, producto natural complejo, que además de solidificar el medio provee datos sobre la capacidad proteolítica de algunos gérmenes.

La finalidad de su uso es permitir el crecimiento y la obtención de cultivos puros en el interior o en la superficie sólida o semisólida del medio que contacta directamente con la fase gaseosa.

Los medios sólidos tienen de 1,5% a 2% de agar, se utilizan para la formación de colonias, en tanto que los semisólidos tienen de 0,3% a 0,5% de agar y no se utilizan para la formación de colonias, sino para observar algún carácter específico, como la movilidad, y/o para conservar cepas. El agar es sólido a temperatura ambiente, hasta aproximadamente 40°C. Para licuarlo se utiliza la ebullición a baño maría.

**2. a MEDIOS NATURALES**

Son aquellos en los que todos sus componentes son sustancias biológicas de las cuales no se conoce su composición cuali ni cuantitativa, son útiles para una amplia gama de MO, incluidos aquellos cuyo requerimiento de factores de crecimiento no se conoce con exactitud o son múltiples.

**2. b MEDIOS SINTÉTICOS**

Son aquellos de composición química conocida, definida cuali y cuantitativamente permitiendo la estandarización y la repetición.

**3. a MEDIOS MÍNIMOS**

Son aquellos que presentan en su composición la base mínima de nutrientes capaz de permitir el desarrollo del Microorganismo en estudio; son de uso frecuente para el cultivo de Microorganismos

poco exigentes, también sirven de base para otros medios. Su composición es muy simple, contienen: cloruro de sodio, extracto de carne (fuente de vitaminas y coenzimas), peptona (proteínas parcialmente hidrolizadas) y agua. Utilizan para el desarrollo, aislamiento y conservación de Microorganismos. Ej.: caldo nutritivo (CN), agar nutritivo (AN), agar Tripteína-soya (ATS).

### 3. b MEDIOS DIFERENCIALES E INDICADORES

Son aquellos que permiten determinar características metabólicas o marcadores genéticos de Microorganismos, sin inhibir sus funciones fisiológicas. En estos se incluyen diversos colorantes e indicadores de pH y otros componentes, que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a identificar a las bacterias aisladas. Estos medios no contienen sustancias inhibitorias. Ej.: Agar azul de bromotimol-lactosa-cistina (CLDE) permite la **diferenciación** de bacterias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras. La degradación del hidrato de carbono a ácido origina un viraje del color hacia el amarillo del Azul de Bromotimol. La alcalinización provoca un viraje hacia el azul intenso.

### 3. c MEDIOS ENRIQUECIDOS

Son aquellos que por el agregado de algunos componentes como sangre, suero, extractos de tejidos vegetales o animales al CN, AN, ATS, proveen al medio de nutrientes adicionales, que permiten el desarrollo de bacterias exigentes. Se debe tener presente que algunos medios base son considerados medios enriquecidos sin ningún otro agregado, debido al alto contenido de nutrientes que poseen. Ej.: Caldo infusión Cerebro-Corazón (ICC).

**-Agar sangre:** para su preparación se agrega sangre al 5% a una base de agar fundido y enfriado a 50°C. Es adecuado para el cultivo de bacterias exigentes (neumococos, estreptococos, etc.). Es además un medio diferencial porque pone de relieve una hemolisina bacteriana que permite diferenciar las especies hemolíticas de las no hemolíticas. En las primeras se observa alrededor de las colonias la formación de dos tipos de halos:

*Transparente* que denota una **hemólisis total**, que corresponde a las especies beta hemolíticas (Ej. Estreptococos del grupo A y algunos del grupo D, etc.).

*Verdoso* que denota una **hemólisis parcial**, y corresponde a las especies alfa hemolíticas (ej. Estreptococos del grupo no A, Neumococos, etc.).

A las especies no hemolíticas se las denomina gama hemolíticas o anhemolíticas.

La sangre posee dos factores importantes para el desarrollo de los Microorganismos: el factor X (hemina) y el factor V (NAD o NADP), donde este último se halla contenido en el interior de los hematíes. Casi todas las bacterias son capaces de sintetizar estos factores, a diferencia de otras, como las del género *Haemophilus* (ej. *H. influenzae*).

**-Agar chocolate:** en su preparación se agrega sangre a una base de agar fundido y enfriado a 50°C y se calienta luego a 80°C, agitando con el cuidado de no producir espuma, hasta que se logra un color marrón. Se han liberado de la sangre al medio, los dos factores, (el factor X y el factor V). El factor X es empleado por los MO para elaborar citocromo y otros pigmentos respiratorios aeróbicos. El factor V actúa como receptor intermediario de hidrógeno en los mecanismos respiratorios. Los Estafilococos liberan el factor V en cantidad suficiente como para estimular el desarrollo de otros gérmenes como el *H. influenzae* que no lo produce; de ahí que si sembramos en una placa de agar sangre que solo contenga el factor X de ambos Microorganismos, el *Haemophilus influenzae* se desarrollará formando colonias mucho más grandes alrededor de las colonias del *Staphylococcus aureus* en el clásico fenómeno de satelitismo.

El agar chocolate es un **medio enriquecido** ideal para el **aislamiento** de *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo), *Neisseria meningitidis* (meningococo),

### 3. d MEDIOS SELECTIVOS

Si los requerimientos nutricionales de un Microorganismo son conocidos es posible desarrollar un conjunto de condiciones en las que su crecimiento específico sea favorecido y el de otros impedi-

do, permitiendo así su aislamiento a partir de poblaciones mixtas aun cuando esté en menor proporción.

La adición de ciertas sustancias químicas al cultivo impide el desarrollo de un grupo de bacterias sin inhibir otros. Estos agentes selectivos son muy útiles para detectar la presencia de patógenos específicos en una flora mixta y para su identificación. Ej Caldo Mc Conkey.

#### Son utilizados como agentes selectivos

- Cristal violeta (inhibe el desarrollo de bacterias Gram (+)).
- Verde brillante (utilizado en medios altamente selectivos, eliminan la flora acompañante Gram (+) y Gram (-)).
- El cloruro de sodio en altas concentraciones inhibe a casi todas las bacterias, excepto las halófilas.
- Citrato de sodio.
- Telurito de sodio.
- Selenito de sodio.
- Sales biliares (desoxicolato de sodio), etc.
- También puede hacerse selectivo un medio ajustando la relación a un pH elevado o muy bajo. Ej. : pH 5,6 en medio Sabouraud (para hongos); pH 8-9 para el aislamiento de *Vibrio cholerae*.
- Otros agentes selectivos de uso más reciente son los antimicrobianos: cloranfenicol, cicloheximida, sulfamidas, colistina, etc.
- Los agentes reductores también se adicionan a los medios para hacerlos selectivos y promover el desarrollo de Microorganismo anaerobios. Ej. Ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, cisteína, etc.

Dentro de los medios selectivos hay variación en cuanto a su poder inhibitorio: altamente selectivo o inhibidores, medianamente selectivos y poco selectivos.

**-Agar EMB:** (agar eosina-azul de metileno) es **ligeramente selectivo** y utilizado para el aislamiento de bacilos entéricos. Permite también la **diferenciación** de *E. Coli*, *Enterobacter* y otros MO. Los colorantes contenidos en su fórmula inhiben a muchos microorganismos Gram (+). El medio contiene también lactosa que es degradada por la *E. Coli* y coliformes, el ácido producido por la degradación de este azúcar y la mezcla de los colorantes eosinas y azul de metileno, produce el cambio de coloración de los mismos y su precipitación, tiñendo las colonias. Las *E. Coli* aparecen negro-verdosas con brillo metálico; las de *Enterobacter*, con centro violeta o pardo oscuro y periferia violeta pálido sin brillo metálico o solo en el centro, *Salmonella* y *Shigella* desarrollan colonias transparentes.

**-Agar Mc Conkey:** posee una mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe a Microorganismo Gram (+); lactosa y rojo neutro como indicador de pH.

El aumento en la acidez del medio por la acción fermentadora de las bacterias lactosa (+), produce una coloración roja en sus colonias, las bacterias no fermentadoras (Lactosa (-)) colonias incoloras.

**-Agar SS:** medio más selectivo usado en el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos, etc. El verde brillante, las sales biliares y una elevada concentración de tiosulfato y citrato, inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el tiosulfato y los iones férricos se pone de manifiesto la formación de sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento de las colonias, al precipitar el sulfuro de hierro. La presencia de lactosa produce colonias rojas con las bacterias L(+) y colonias incoloras con las L(-).

**-Agar Bismuto sulfito:** Agar selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella*. El verde brillante y el bismuto sulfito inhiben considerablemente a los gérmenes de acompañamiento. Las colonias de *Salmonella* H<sub>2</sub>S –positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias.

**-Agar Manitol Salado:** es utilizado para la demostración de estafilococos patógenos. La concentración extremadamente alta de cloruro de sodio (7,5%) permite el crecimiento de microorganismos tolerantes a la misma entre los que se encuentran los del género *Staphylococcus*. También contiene manitol, cuya degradación lleva a la formación de ácidos; está notablemente correlacionada con la patogenicidad y sirve para detectar presencia de *Staphylococcus aureus*. La acidez produce en el medio cambio de color (de rojo a amarillo), por viraje del indicador rojo de fenol. Las colonias de *S. aureus* tienen un crecimiento intenso, con formación de un halo amarillo luminoso por ser organismos manitol (+). *S. epidermidis* tiene un crecimiento débil casi siempre y no produce cambio de color (manitol (-)).

**-Agar Thayer Martin:** con el agregado de una mezcla liofilizada de vancomicina, colistin, trimetoprima y nistatina, más aditivos estimulantes del crecimiento, es un medio ideal para el **aislamiento selectivo** de gonococos y meningococos porque inhibe la flora acompañante incluida las saprofitas. Es un medio altamente selectivo.

### 3. e MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Generalmente son caldos destinados a promover el crecimiento de los MO presentes, ej. CN. Se debe tener en cuenta que los caldos también pueden clasificarse en selectivos, diferenciales, enriquecidos, etc., conforme al agregado de diferentes sustancias.

**-Caldos selectivos de enriquecimientos:** contienen agentes inhibidores; favorecen especialmente el desarrollo de Microorganismos patógenos, que generalmente se encuentran en escaso número en las muestras; ej. caldo selenito, caldo tetrationato, etc.

**-Caldo Azida glucosa:** utilizado para el crecimiento selectivo de enterococos. la azida sódica es una sustancia que inhibe los gérmenes gram (+) acompañante por acción bacteriostática y respeta a los enterococos (*streptococcus faecalis*, etc.). El crecimiento de estos a partir de muestras de agua de consumo y residuales sirve como indicador de contaminación fecal. Este crecimiento se pone de manifiesto por enturbiamiento del caldo.

**-Caldo Selenito:** para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* y eventualmente *Shigella* a partir de heces, orina, agua, alimentos, etc., el selenito inhibe el crecimiento de bacterias intestinales coliformes y enterococos, principalmente en las primeras seis horas de incubación y hasta 12 horas. *Proteus* y *Pseudomonas* no son inhibidos.

**-Caldos Enriquecidos:** el agregado de diferentes sustancias no inhibidoras, por ejemplo, sangre al 5%, a un caldo nutritivo, transforma al medio de enriquecimiento en enriquecido.

**-Caldos Diferenciales:** son aquellos usados para identificación bacteriana, por ej., los caldos de fermentación de hidratos de carbono. Estos están compuestos básicamente por un caldo nutritivo, al cual se le agrega un H de C (lactosa, glucosa, etc.) y un indicador de pH. El cambio de color del medio base, indicará la capacidad del germen de utilizar el hidrato de carbono.

### 4. a MEDIOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Utilizados para la determinación de propiedades bioquímicas de los Microorganismos, que junto a otras características o marcadores genéticos, permiten su identificación (investigación de la degradación de azúcares, metabolismo proteico, lipídico, Ej. TSI, FDA, SIM, etc.).

### 4. b MEDIOS PARA RECuento DE BACTERIAS

Se emplean para la determinación de bacterias contenidas en materiales tales como agua, leche, productos lácticos. Ej. PCA. (Plate count agar o agar cuenta gérmenes). Estos medios no son inhibidores y se usan para recuento total.

#### **4. c MEDIOS DE TRANSPORTE**

Hay otros medios de cultivo especiales para transporte de materiales; son los llamados medios de transporte, líquidos o semisólidos que mantienen viables los MO durante un tiempo variable, y son utilizados para la remisión de las muestras al laboratorio. Cada uno de ellos trae especificaciones en cuanto a su preparación, tiempo de vida útil, etc.

El medio de Stuart consiste de un agar semisólido tamponado (contiene sales que actúan como buffer); está exento de sustancias nutritivas y contiene tioglicolato de sodio como agente reductor. Este medio mantiene un pH favorable e impide la deshidratación de las muestras durante su traslado así como la oxidación y la autodestrucción enzimática de los gérmenes patógenos presentes. Otro medio es el de Cary Blair semejante al anterior, contiene Tioglicolato de Na, Fosfato de sodio, Cl Na, y agar al 5%.

#### **4. e MEDIOS DE MANTENIMIENTO**

Son aquellos que permiten la viabilidad y multiplicación de los gérmenes si se mantienen las condiciones óptimas para su desarrollo.

Algunos gérmenes producen acidez al metabolizar hidratos de carbono, especialmente glucosa, lo que debe evitarse agregando al medio un agente neutralizante, ej. Carbonato de Ca, o bien tampones de fosfatos. Se evita el agregado en estos medios de agentes selectivos Ej. Caldo Tripteína-soya mas glicerina.

## DESARROLLO DE TRABAJO PRÁCTICO 4

Cada grupo de trabajo realizará la siguiente actividad:

- Preparación de medios de cultivo comerciales deshidratados en polvo o granulados.
- Acondicionamiento y esterilización de los medios de cultivo.
- Almacenamiento.

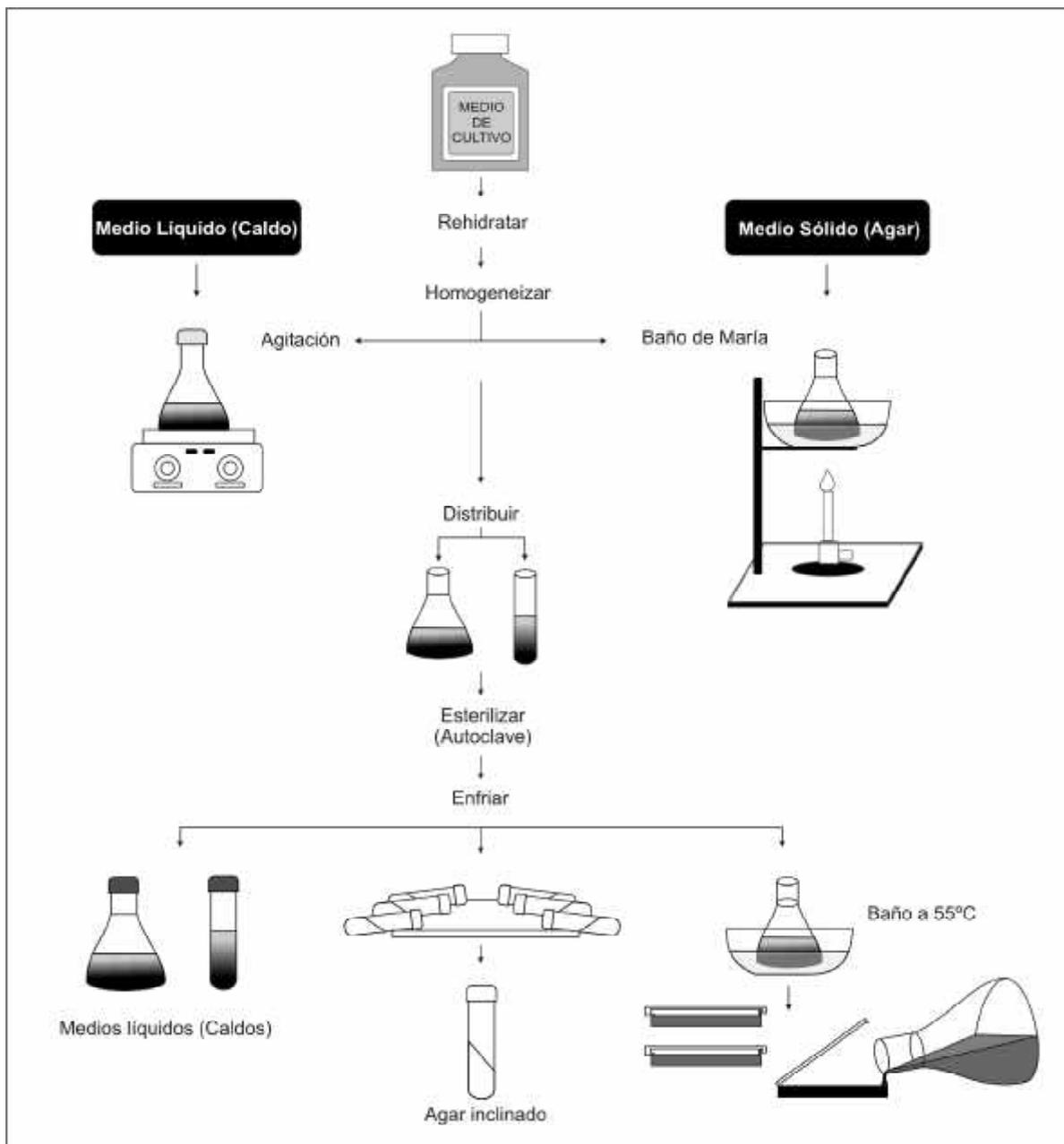


Figura original del "Manual práctico de Microbiología" (Díaz y cols.).

Figura 4.1: Preparación y acondicionamiento de medios de cultivo.

## 1-DISOLUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DESHIDRATADO

- Para la preparación de medio de cultivo se utiliza agua destilada y/o desmineralizada cuya reacción sea cercana al pH neutro.
- Los recipientes destinados a la preparación (Erlenmeyer) deben estar bien limpios y ser lo suficientemente grandes de tal forma que quede una cámara de aire para evitar que se moje el tapón de algodón y para que el medio de cultivo que se prepara pueda agitarse con facilidad.
- Al medio de cultivo deshidratado y pesado se le añade aproximadamente la mitad de la cantidad necesaria de agua y se lo deja reposar unos minutos, luego se agita suficientemente para conseguir una suspensión homogénea. Después se incorpora la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridos a la pared interna del recipiente.
- Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario.
- Los medios nutritivos que no contienen agar ni gelatina se pueden disolver en agua fría o bajo ligero calentamiento.
- Los medios nutritivos que contienen agar o gelatina deben ser calentados para conseguir su disolución. Este calentamiento se realiza a bañomaría.
- En caso de medios de cultivo que no deban ser sometidos a ulterior esterilización en autoclave es imprescindible prestar atención a su disolución completa. Puede decirse que se ha alcanzado este grado cuando al agitar no se adhiere a la pared interna del recipiente partícula alguna de agar y la solución, viscosa, resbala libremente.

## 2-DISTRIBUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y ESTERILIZACIÓN

Antes de su esterilización es conveniente repartir el medio de cultivo en proporciones más pequeñas, por ejemplo en los recipientes definitivos. Ej. Tubos de ensayo y/o Erlenmeyer tapados con algodón y protegidos con una capucha de papel, la que se ajusta con una bandita elástica o hilo de algodón.

Se debe cuidar que durante su fraccionamiento el medio de cultivo permanezca caliente, para evitar solidificación del mismo durante la operación.

- Tubos para punción cargar 1/5 o 1/4 de su altura.
- Tubos para estrías cargar 1/3 o 1/2 de su altura.
- Tubos con medio líquido cargar 2, 5; 5 y 10 ml.

Una vez fraccionado el medio en los tubos, estos se cierran con tapones de algodón, se colocan en una cestilla de alambre y protegidos por una capucha de papel ajustada con una banda elástica.

Si las normas de preparación no indican otra cosa, la esterilización se realiza en autoclave a 121°C, 1 atmósfera de presión y durante 15 minutos.

Temperaturas más altas y calentamientos más prolongados de lo previsto, perjudican la calidad del medio de cultivo.

## 3-AJUSTE DE pH

El valor de pH depende mucho de la composición del medio de cultivo, de la temperatura que tenga este medio de cultivo en el momento de su medición y del tratamiento a que se haya sometido dicho medio de cultivo durante su obtención (disolverlo, esterilizarlo).

Por este motivo la medición del pH se hace después de la esterilización. Para realizar esta medición se utiliza un “peachímetro”, aparato medidor del pH.

En los medios de cultivo sólidos, la medición del pH se realiza a temperatura ambiente y/o hasta 45°C.

El pH se ajusta al valor indicado para cada medio de cultivo. La corrección se logra con la adición de una solución 1N o 1/10 N de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio a una muestra del medio de cultivo estéril.

#### **4- VERTIDO DE PLACAS**

Para evitar la formación de gotitas de condensación de agua en la tapa de las placas de Petri debe verterse en ellas 20 ml del medio de cultivo estéril y enfriado a una temperatura de 45°C al resguardo del mechero.

Antes de sembrar las placas puede secarse la superficie húmeda del agar (que podría favorecer el desplazamiento de microorganismos ) en estufa a 30-40°C durante 30 minutos. Para ello se coloca la parte inferior de la placa de Petri, con su cara interna hacia abajo, algo destapada, sobre la tapa que ahora sirve de apoyo a la placa.

#### **5- TUBOS PARA AGAR INCLINADO – PICO FLAUTA – ESTRÍA**

Los tubos llenos con medio de cultivo esterilizado, todavía líquidos, se colocan en una posición inclinada, de tal forma que se forme una capa de aproximadamente 3 cm y una superficie inclinada de iguales dimensiones. El medio de cultivo se deja solidificar en la posición lograda.

#### **6- CONSERVACIÓN**

Los medios de cultivo preparados, listos para el uso, tienen solo un tiempo limitado de conservación, que es de varios meses en condiciones adecuadas.

- A temperatura ambiente 1- 2 semanas protegidos de la luz.
- A 12 - 15°C tiempo más prolongado.
- A 0°C los medios de cultivo con agar no deben guardarse, ya que se altera la estructura del gel.

La pérdida de agua puede provocar precipitado o hacer que cristalicen ciertas sustancias del medio de cultivo, como también originar grietas en las placas que contengan medio de cultivo.

#### **7.-DESCONTAMINACIÓN**

Desinfección térmica de recipientes descartables (plásticos) en autoclave a 121°C 30 minutos dentro de bolsas de plástico de alto punto de fusión. A continuación se tiran a la basura.

Desinfección térmica de recipientes de vidrio, tubos de cultivo, placas de Petri (con microorganismos inoculados) autoclave 121°C 30 minutos. Solo entonces se procederá a la limpieza de los recipientes o aparatos. Desinfección química: se lleva a cabo mediante desinfectantes adecuados y que hayan sido aprobados. Las sustancias activas en ellos son eficaces para microorganismos vegetativos y no contra esporas. En este tipo de desinfección todos los objetos tienen que estar totalmente en contacto con el desinfectante durante 6 horas como mínimo.



## TRABAJO PRÁCTICO 5

### SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

#### OBJETIVOS

- *Conocer diferentes metodologías de siembra para microorganismos.*
- *Realizar el aislamiento de una especie bacteriana desde una muestra clínica conteniendo varios microorganismos.*
- *Realizar la observación de colonias microbianas e interpretar los diversos desarrollos en los distintos medios de cultivo sembrados.*
- *Valorar la necesidad de realizar correctamente la siembra y el aislamiento de microorganismos para el acertado análisis de una muestra.*

#### INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros.

Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de esta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

Para obtener cultivos axénicos puros, a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento que fueron desarrolladas durante el siglo XIX. En un principio, Lister utilizó diluciones seriadas en medio líquido con esta finalidad, pero la presencia de contaminación, es decir, la presencia de microorganismos no deseados, dificultó el aislamiento. La escuela de Robert Koch introdujo los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en bacteriología, permitiendo así la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior del mismo.

La esencia de la microbiología está integrada por dos clases de operaciones: el *aislamiento*, que es la separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza, y el *cultivo*, que es el crecimiento de poblaciones microbianas en ambientes artificiales (medios de cultivo) bajo condiciones de laboratorio. Estas dos operaciones entran en juego sin tener en cuenta la clase de microorganismo que está manejando el microbiólogo, son básicamente iguales para el estudio de los virus, las bacterias, hongos, algas, protozoos e incluso para el de pequeños invertebrados. Además, en los últimos años se han extendido a los estudios de aislamiento de líneas de células de tejidos derivados de animales y plantas (*cultivo de tejido*).

#### SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

Es la colocación de un microorganismo en un medio nutritivo adecuado, para lograr su desarrollo y reproducción. Posteriormente, se lleva el medio sembrado a incubación en estufa o baño a temperatura constante para lograr el máximo desarrollo del germen.

Como cada germen tiene una temperatura óptima de crecimiento, debe ajustarse el termostato de la estufa de cultivo a cada necesidad particular. No obstante, la mayoría de los gérmenes no patógenos crecen mejor con temperaturas que oscilan entre 25 a 37°C.

#### FINALIDAD DE LA SIEMBRA

La inoculación de microorganismos en medios adecuados persigue dos objetivos fundamentales:

**Aislamiento.** Se realiza cuando se desea separar especies bacterianas contenidas en un material contaminado, para lo cual se siembra en medios de cultivo para permitir su separación mediante el desarrollo de colonias aisladas. Debe realizarse siempre en medios sólidos en placas de Petri.

**Subcultivo.** Puede realizarse en medios líquidos o sólidos, se realiza en las siguientes situaciones:

- Cuando el medio original está agotado de nutrientes, se pasa una parte del desarrollo de este medio a un nuevo medio con proporciones óptimas de nutrientes. Ej. mantenimiento de cepas microbianas.
- Cuando se desea contar con un número importante de microorganismos, por ejemplo de las diferentes colonias aisladas en un medio de cultivo para aislamiento, con el objeto de obtener un cultivo axénico para posteriormente realizar otros estudios, (ej. pruebas bioquímicas, sensibilidad a antimicrobianos, etc.).
- Cuando se coloca una sola especie bacteriana en distintos medios adecuados, (ej. medios para identificación) con la finalidad de que se reproduzca en ellos para observar su comportamiento, definir propiedades, etc.

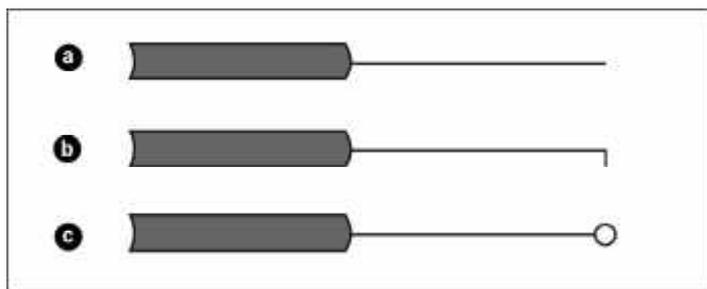
### REQUISITOS DE LA SIEMBRA

- Medios de cultivo adecuados y estériles.
- Realizar todos los procedimientos con las más rigurosas técnicas de asepsia.
- Contar con los materiales de rutina necesarios (ej. El material a sembrar, pipetas estériles para la siembra, ansas, mecheros, soluciones desinfectantes, etc.).

### ELEMENTOS DE LA SIEMBRA

El material necesario para la *inoculación primaria* de muestras es relativamente simple. Pueden emplearse asa/ansa, hisopos, pipetas graduadas, pipetas de Pasteur, jeringas, etc. La *diseminación del inóculo* en la superficie de una placa con medio sólido puede realizarse con ansa ojal, hisopo o espátula de Drigalski.

**Asa/Ansa.** Está confeccionada de un alambre de platino u otro material inserto en un mango para facilitar su manejo. Son más usadas las asas de micrón, un material mucho más barato y resistente o las asas de plástico desechables y calibradas en diversas capacidades (1 µl, 5 µl, 10 µl). Existen distintos tipos de ansas que se utilizan en función del procedimiento microbiológico que se requiera realizar (Fig. 5.1):



**Figura 5.1:** Asa /ansas empleadas en la siembra de microorganismos. a) Recta, b) en L, c) ojal.

**a) Ansa recta o aguja.** Es un alambre recto fijado a un mango. Se utiliza para transferir colonias de una placa a otra, sobre todo para la inoculación de medios sólidos y semisólidos en tubos (picadura).

**b) Ansa en L.** Es un alambre recto con el extremo doblado a 90°. Se emplea para repique de hongos filamentosos en Micología.

**c) Ansa ojal.** Es un alambre que en su extremo anterior tiene la forma de un círculo cerrado de 2-3 mm de diámetro. Su principal aplicación es la estriación de placas y la siembra en medios líquidos; el ansa calibrada se utiliza para recuento de colonias.

**Hisopos.** Son muy útiles para efectuar la primera parte de la siembra (inóculo primario) a partir de la muestra, para la transferencia de cultivos líquidos a placa y para la inoculación masiva de estas a partir de suspensiones de colonias aisladas.

**Jeringa.** Son adecuadas para la inoculación de muestras tomadas mediante punción y transportadas dentro de ellas. Además se aplican para los subcultivos en placa a partir de frascos de hemocultivo y para transferir cultivos líquidos.

**Pipeta graduada o micropipeta.** Se emplea para transferir un inóculo primario (líquido) que requiera de un volumen exactamente medido, para recuento de microorganismos.

**Pipeta de Pasteur.** Utilizada para la inoculación de muestras líquidas o transferencia de cultivos líquidos. Actualmente se emplean con preferencia las pipetas estériles de plástico, desechables.

**Espátula de Drigalski.** Es una varilla fina de vidrio, acodada en ángulo recto en uno de sus extremos en forma de L o de triángulo equilátero. Se utiliza para inoculación masiva de placas, aunque su uso es muy limitado. Empleada en muestras de alimentos, para hongos y levaduras. (Fig. 5.2).



Fig. 5.2: Espátula de Drigalsky.

## TÉCNICA Y MÉTODO DE SIEMBRA

El cultivo de gérmenes puede hallarse en un tubo con caldo de cultivo (medio líquido), en un tubo con medio semisólido (SIM o BAM), o en un medio sólido (en tubo inclinado o placa). La siembra puede realizarse a:

1. Medio líquido.
2. Medio semisólido.
3. Medio sólido.

### 1) Siembra a medios líquidos

**Desde un medio líquido:** se tiene un medio de cultivo con gérmenes, por ejemplo caldo ICC, sembrado con anterioridad, en el cual los microorganismos han desarrollado (evidenciado por turbidez, película o sedimento) y del cual queremos tomar material para practicar una siembra en otro tubo con un caldo nuevo.

Antes de realizar la siembra en el nuevo caldo, se debe homogeneizar el medio de cultivo original, para que la carga microbiana por unidad de volumen sea pareja en todo el medio.

Para ello podemos seguir dos caminos:

a) Se puede homogeneizar el contenido líquido del tubo (tapado con un tapón de algodón) con un movimiento de rotación entre ambas palmas de las manos, para luego extraer el tapón (al resguardo de la llama del mechero) y sembrar en el otro tubo.

b) Se extrae el tapón (al abrigo de la llama del mechero) y se introduce una pipeta estéril en el medio cultivado, con la cual se homogeniza de la siguiente forma: se aspira levemente con la pipeta y simultáneamente se eleva el tubo de ensayo, una vez cargada con buena cantidad de cultivo, se sopla a través de ella, descargándola a la vez que se desciende con la pipeta.

c) Una vez homogeneizado el tubo madre, se toman ambos tubos con la mano izquierda.

- La pipeta utilizada para la homogeneización se descarta colocando en un frasco con desinfectante.
- En la mano derecha se tendrá la pipeta estéril con la que se procederá a realizar la siembra, o el mango con el ansa esterilizada en la llama del mechero. Con los dedos meñique y anular de dicha mano se destapan los tubos de ensayo (al abrigo de la llama).

- Se introduce el ansa o la pipeta en el tubo madre, retirando una cantidad de inóculo, el cual se descarga en el tubo con caldo nuevo. Se tapan nuevamente los tubos con los tapones antes retirados y se descarta la pipeta utilizada, en el frasco con desinfectante, o se esteriliza el mango dejándolo luego sobre la mesada. (Fig. 5.3. b y c).

- Los tubos con caldo se pueden inocular por el método ilustrado en la figura 5.4. Inclinar el tubo a un ángulo de aproximadamente 30° y acercar un asa con el material a inocular a la superficie interior del vidrio, justo sobre el punto en el que la superficie del líquido forma un ángulo agudo. Cuando el tubo de cultivo se vuelve a la posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie.

- Una vez realizada la siembra, se rotula el nuevo caldo sembrado.
- En el rótulo deben incluirse datos correspondientes al inóculo. Normalmente son los siguientes :
  - Germen sembrado o material.
  - Fecha de siembra.
  - Medio de cultivo utilizado.
  - Nombre del Laboratorista.

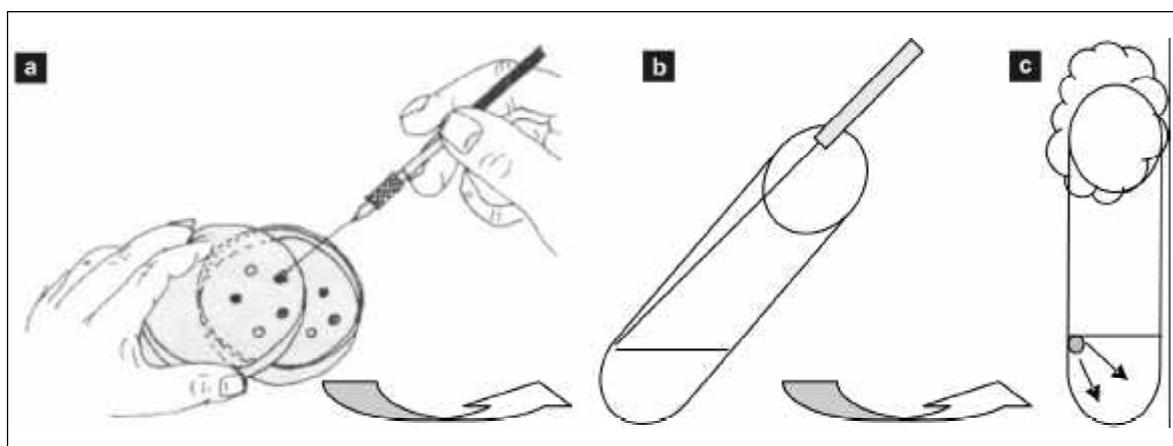


Figura.5.3. Siembra en medio líquido desde un medio sólido

**Desde un medio sólido:** para tomar el germen desde una placa sembrada con microorganismos, deberá escogerse una placa con colonias perfectamente aisladas procurando de tocar una sola colonia con el ansa aguja (Fig. 5.3a) para transferir al medio de cultivo apropiado. Se acerca el ansa al borde del líquido con el tubo inclinado (Fig. 5.3b) y suavemente se incorpora el inóculo al caldo. Luego se endereza el tubo (Fig. 5.3c) y se lo mueve para permitir que el inóculo difunda a todo el caldo. También puede realizarse previo a la transferencia, un inóculo en un tubo conteniendo un medio mínimo o solución fisiológica estériles.

## 2) Siembra a medios semisólidos:

Se utiliza el Método de la **PICADURA o punción**. Es útil fundamentalmente para dos fines:

- Observación de motilidad de los gérmenes.
- Licuación de la gelatina.

En estos casos se utiliza ansa aguja.

Para la siembra se utilizan medios de cultivo frescos en tubos de ensayo, solidificados a nivel horizontal (Agar al 0,5 - 0,8%). Se realiza una punción central y vertical con el ansa cargada con el inóculo, cuidando de retirarla por la misma perforación practicada al penetrar al medio con ella (Fig. 5.4a). Un movimiento en abanico (Fig. 5.4b) durante la inoculación de este medio puede dar como resultado un patrón de desarrollo a lo largo de la línea de siembra que se puede interpretar falsamente como movilidad bacteriana.

Una vez retirada la aguja, se tapa el tubo y se lleva a incubar.

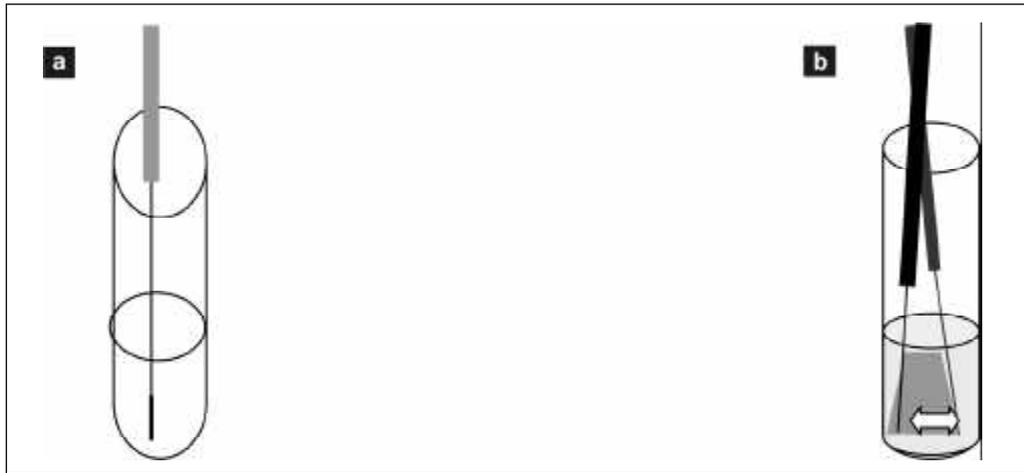


Figura 5.4. Siembra en medio semisólido.

La manifestación de motilidad se observa ya que se aprecia desarrollo microbiano en todo el medio o en parte de él, lo que es indicación que los gérmenes sembrados son móviles. Caso contrario, el desarrollo es solamente en la picadura.

### 3) Siembra a medios sólidos:

Se destapa el tubo con el caldo de cultivo y se recoge material con ansa (previamente esterilizada), o con pipeta estéril, para luego volver a tapar el tubo.

El medio sólido fresco lo podemos tener solidificado en placas de Petri o en un tubo de ensayo, ya sea como agar inclinado o en pico de flauta. (Fig. 5.5).

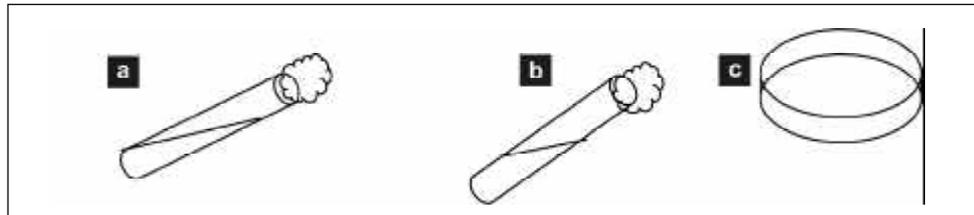


Figura 5.5: a. agar inclinado, (b) en pico de flauta, (c) placa de Petri con medio de cultivo.

Podemos realizar entonces dos técnicas de siembra:

- Agotamiento en estría (utilizado indistintamente en uno u otro caso). (Fig. 5.6).
- Método de extensión de la espátula o diseminación (solo en placa de Petri). (Fig. 5.9).

#### Agotamiento en estría:

Puede ser realizado en tubos con agar inclinado o en placas (de preferencia). En este caso se utilizan inóculos tomados con el anillo del asa, y se siembran directamente, o bien se practican diluciones con factor conocido, y se siembran en distintas placas. Fig. 5.6.

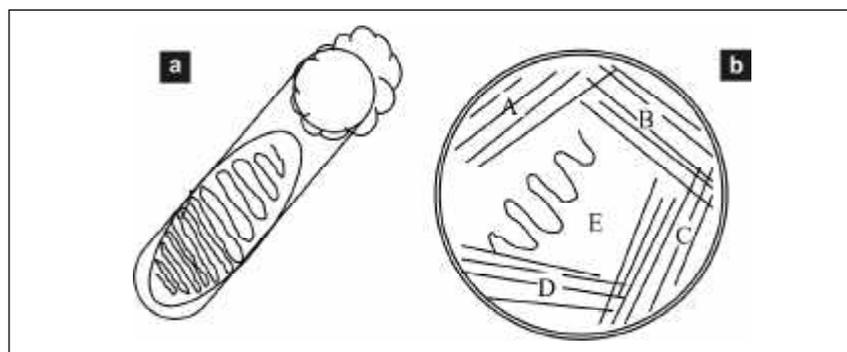
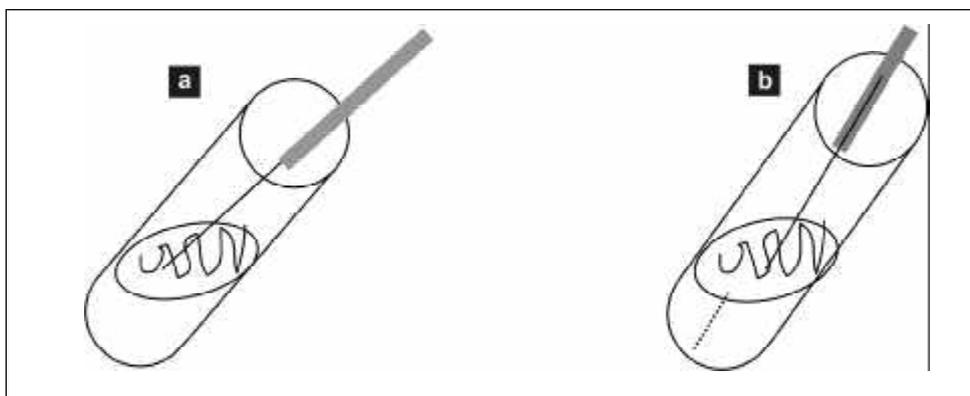


Figura 5.6: Método del agotamiento en estría.

**a) Agar en Tubos:** en este caso se comienza a estriar por la base del tubo. Los tubos con agar en “pico de flauta” se pueden sembrar en “S” en la superficie inclinada (Fig. 5.7a), o inocular primero atravesando el agar en profundidad, y se continúa en “S”, luego de retirar el alambre de la parte profunda (Fig. 5.7b).



*Figura 5.7. Siembra en medio sólido en pico de flauta.*

**b) Agar en Placas de Petri:** se carga el ansa con el inóculo desde un tubo con caldo de cultivo o mediante el toque de una colonia aislada en placa de Petri. Luego se toma la base de la placa de Petri, donde se encuentra el medio de cultivo sólido fresco, y se la levanta hasta la altura de la llama del mechero, a unos 20 cm. de la misma.

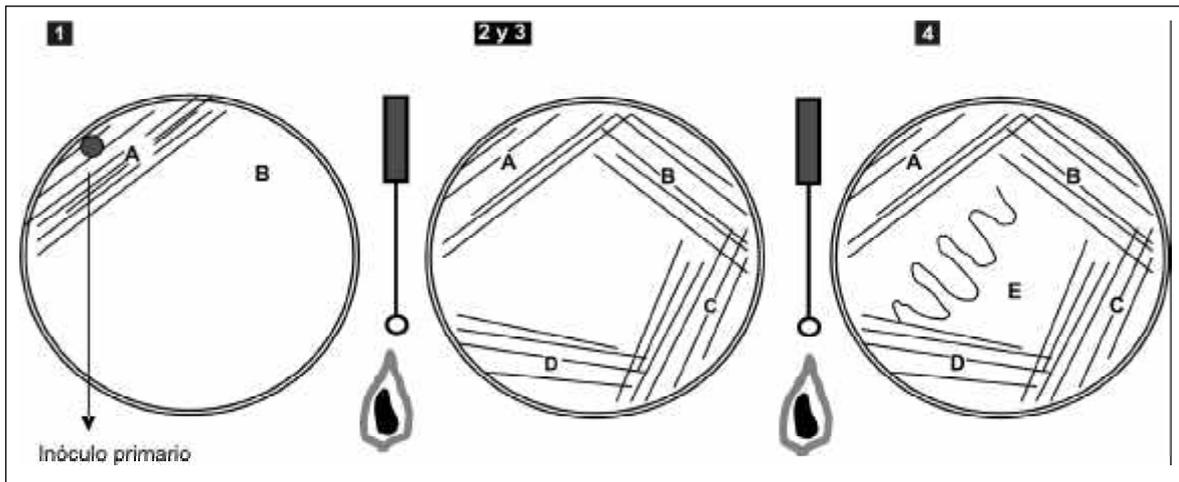
Rápidamente, para evitar la contaminación, se practica con el anillo del ansa movimientos de zig - zag de forma tal que marque estrías sobre la superficie del agar, depositando así en forma esparcida (sobre las estrías) el inóculo (Figura 5.8).

Se gira la placa 90°, se quema el ansa, se enfría y se procede a un nuevo estriado en la Zona B, cuidando de tocar solamente las dos últimas estrías del cuadrante anterior y tratando de realizar un gran número de estrías, muy cercanas entre sí. Tener en cuenta que es necesario hacer de 50 a 100 estrías para obtener colonias lo suficientemente aisladas.

Se gira nuevamente la placa otros 60°, se quema el asa, se enfría y se procede al estriado de la zona C. Se repite el procedimiento para la zona D y sin quemar el asa se realiza la cola de pescado en la zona E. A medida que progresa la siembra (o sea mayor cantidad de estrías hechas), el inóculo inicial tiene cada vez menor carga bacteriana, quedando por ende en las últimas estrías (zona E y a veces ya la zona D) los gérmenes más separados unos de otros, formando así, con su desarrollo colonias separadas y de límites diferenciados.

Tapar las placas. Incubar.

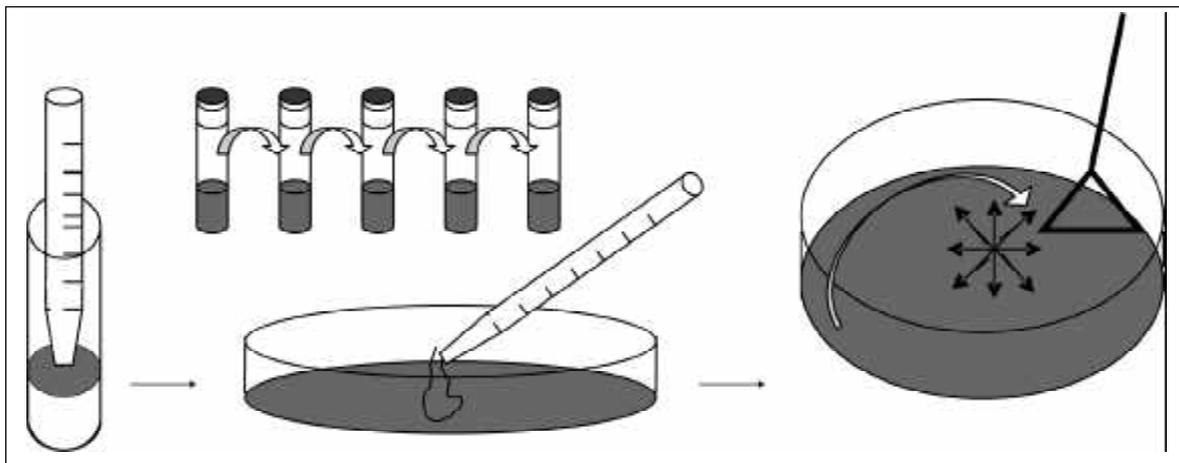
El propósito de esta técnica es diluir el inóculo suficientemente sobre la superficie del agar para obtener colonias bacterianas bien aisladas a partir de unidades formadoras de colonias. Las colonias aisladas se pueden luego subcultivar individualmente transfiriéndolas a otros medios a fin de obtener cultivos puros que pueden ser estudiados en medios diferenciales.



**Figura 5.8.** Método de agotamiento en estría en placas de Petri. 1). Se coloca el inóculo primario en la zona A y se disemina en zig-zag con estrías muy juntas, 2). Esterilizar el ansa, girar la placa 60°, tocar tres a cinco veces la estría de la zona A y estriar la zona B, 3). Reiterar el procedimiento 2 para la zona C y D, 4). Para terminar dibujar una estría en zig-zag en la zona E (el espacio que queda entre los cuatro cuadrantes).

**Método de la extensión de la espátula o diseminación:**

Para este método se utiliza una espátula de Drigalsky esterilizada a la llama del alcohol. El inóculo se deposita en el centro de la placa con pipeta estéril (generalmente entre 0,1 a 1 ml) y se disemina en todas direcciones en la espátula.



**Figura 5.9:** Empleo de la Espátula de Drigalsky para la diseminación en superficie de agar.

**ASLAMIENTO DE MICROORGANISMOS**

La identificación de una bacteria necesita su previa obtención en cultivos puros; de otro modo nos hallaremos muy a menudo en presencia de una mezcla de muchas bacterias. Interesa, pues, separarlas y aislarlas.

La separación de las bacterias se realiza en la práctica en medios sólidos mediante el método de agotamiento en estría en placas de Petri. Cada colonia aislada representa la descendencia de una única bacteria. Haciendo una picadura de una colonia bien aislada, se obtendrá un cultivo puro.

**INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS**

La interpretación de los cultivos primarios luego de 24-48 hs de incubación requiere una considerable destreza. El microbiólogo debe evaluar si hubo desarrollo microbiano en medios líquidos o sólidos y decidir si se requieren procedimientos adicionales.

**Evaluación de medios líquidos:**

En un medio LÍQUIDO, la población celular bacteriana en crecimiento no forma colonias delimitadas e identificables unas de otras, ya que no presenta una base fija de apoyo sobre la cual desarrollar. En cambio ponen de manifiesto el crecimiento de los gérmenes por:

- Presencia de grumos (fig 5.10a).
- Presencia de turbidez (fig 5.10b).
- Formación de sedimento (fig 5.10c).
- Formación de velo (Fig 5.10 d.1. *Velo superficial*, d.2. *Velo intermedio*).

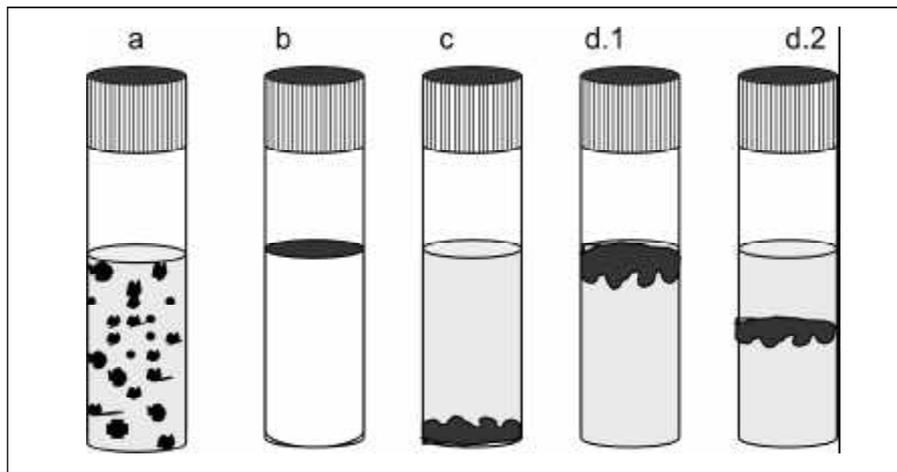


Figura 5.10. Desarrollo microbiano en medio líquido.

**Evaluación en medios sólidos:**

Se efectúa mediante un examen macro y microscópico:

1. Observando las *características y cantidad relativa* de cada tipo de colonia aislada en agar.
2. Observando los *cambios en el medio* que rodea las colonias, que reflejan la *actividad metabólica* específica de las bacterias recuperadas.
3. Determinando la *pureza, reacción de Gram y morfología de las bacterias* de cada tipo de colonia.

**1) Características macroscópicas de las colonias:**

**COLONIA:** es la agrupación de millones de células bacterianas, que en el caso de provenir de una sola bacteria se denomina clon o clona. La colonia bacteriana tiene características constantes para cada especie.

Las colonias así formadas tienen dimensiones desde las mínimas (apenas visibles), hasta varios milímetros de diámetro. Presentan características no solo de volumen sino también de forma y textura y, en algunos casos, de color, lo cual a veces resulta de gran valor diferencial en condiciones establecidas constantes. Por lo tanto, la morfología de las colonias es de fundamental importancia en el aislamiento primario.

Se deben considerar los siguientes aspectos (cuadro 5.1):

**1- Tamaño:**

Las dimensiones de las colonias bacterianas son muy uniformes para cada especie.

Pequeñas (menor de 1 mm), por ej. *Streptococos*.

Medianas y grandes (varios mm), por ej. *Estafilococos* o *Salmonella*.

**2- Forma:**

Depende de su borde y espesor.

**3- Elevación:**

Cuando el espesor es mucho mayor en el centro y disminuye uniformemente hacia el borde se dice que la colonia es elevada, siendo entonces convexa en mayor o menor grado, en ocasiones tanto que casi tiene forma hemisférica.

Al corte transversal pueden presentar un aspecto plano o elevado en mayor o menor grado, pudiendo ser: mamelonada, crateriforme, etc.

**4- Borde:**

El borde puede ser liso irregular, lobulado o aserrado en mayor o menor grado.

**5- Color:**

Las colonias bacterianas suelen ser blancas o beige y solo en algunos casos toman coloraciones diferentes, o cuando ponen de manifiesto alguna característica metabólica. Las colonias fúngicas toman colores diversos: verde, negras, azules, naranjas, amarillas, etc.

**6- Superficie de crecimiento:**

Puede ser uniformemente lisa o estriada, con indentaciones, radial o concéntrica, continua o con roturas.

**7- Densidad:**

De acuerdo al crecimiento leve o exuberante podemos observar colonias más densas o más laxas.

**8- Consistencia o textura:**

Van desde las colonias secas y friables, hasta las viscosas.

**9- Pigmentación:**

Es más frecuente en bacterias saprofitas, y la masa celular puede tener color rojo, anaranjado, amarillo, etc. De los patógenos, el único pigmentado es el *S. aureus* (amarillo oro).

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias se realiza usualmente mediante el examen visual del desarrollo en la superficie de las placas de agar.

La inspección de los cultivos se lleva a cabo sosteniendo la placa con una mano y observando la superficie del agar para comprobar la presencia de desarrollo bacteriano. Se debe estudiar con cuidado cada placa debido a que las bacterias aisladas inicialmente a partir de muestras constituyen, a menudo, cultivos mixtos y puede haber una variedad de tipos de colonias. Las colonias puntiformes constituidas por bacterias de desarrollo lento pueden pasar inadvertidas entre las de mayor tamaño.

Durante el examen las placas se deben inclinar en distintas direcciones con iluminación brillante directa, de modo que la luz sea reflejada desde diversos ángulos. Algunos microbiólogos utilizan una lupa o un microscopio de disección para ayudarse en la detección de colonias minúsculas y observar mejor sus características. Las placas de agar sangre se deben examinar también a trasluz, empleando iluminación brillante, a fin de detectar reacciones hemolíticas en el agar.

1. Tamaño	2. Forma	3. Elevación	4. Borde
Diámetro en mm	Puntiforme  Circular  Filamentosa  Irregular  Rizoides  Fusiforme 	Plana  Elevada  Convexa  Monticular  Umbeliforme  Umbilicada 	Entero  Ondulado  Lobulado  Aserrado  Filamentosa  Rizado 
5. Color	6. Superficie	7. Densidad	8. Consistencia
Blanco Amarillo Negro Beige Naranja Verde, etc.	Lisa o rugosa Mate o brillante Seca o cremosa Invasiva o superficial, etc.	Opaca Translúcida Transparente etc.	Butirosa Viscosa Membranosa Quebradiza etc.

Cuadro 5.1. Características de las colonias usadas en la identificación de bacterias.

**10- Olor:**

Los microorganismos que exhiben olores característicos son:

- Pseudomonas* spp (zumo de uva).
- Proteus* spp (chocolate quemado).
- Streptomyces* spp (sótano enmohecido).
- Clostridium* spp (fétido, nauseabundo).

**2) Cambios en el medio que rodea las colonias.** Se resumen en el cuadro 5.2

1. Hemólisis en agar sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Alfa</u>: halo de hemólisis parcial de glóbulos rojos alrededor de las colonias con coloración verde del medio.</li> <li>- <u>Beta</u>: halo de hemólisis total de glóbulos rojos alrededor de las colonias, debido a la lisis de los glóbulos rojos.</li> <li>- <u>Gamma</u>: no hay hemólisis de glóbulos rojos ni cambio en el medio que rodea la colonia.</li> </ul>
2. Producción de pigmentos en medio de agar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pigmentos hidrosolubles que colorean el medio. Píocianina</li> <li>- Pigmentos fluorocromicos.</li> <li>- Pigmentos no difusibles confinados a las colonias.</li> </ul>
3. Cambios en medios diferenciales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En los medios diferenciales se incluyen diversos colorantes, indicadores de pH y otros componentes que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a identificar las bacterias aisladas.</li> </ul>

*Cuadro 5.2. Reacciones en medio de agar utilizado en la identificación de bacterias.*

Estas características son útiles en la selección de otros medios y pruebas diferenciales apropiadas para completar la identificación de los aislamientos.

**3) Características Microscópicas.** Las impresiones basadas en la observación de las características de las colonias pueden ser confirmadas luego estudiando extendidos coloreados con la reacción de GRAM.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 5

Cada grupo de trabajo realizará, bajo la supervisión y directivas del docente, los siguientes procedimientos:

### **Siembra de Microorganismos:**

- Siembra en tubos con caldo, agar semi-sólido y en pico de flauta del material en estudio.
- Siembra por diseminación en superficie con espátula de Drigalsky.
- Incubación a 35-37°C, durante 18-24 hs.

### **Aislamiento de Microorganismos:**

- Siembra para aislamiento en placas de las muestras en los distintos medios de cultivos.
- Incubación a 35-37°C, durante 18-24 hs.

### **Lectura e interpretación de los cultivos (a las 24 hs):**

- Características macroscópicas de las colonias.
- Coloración de Gram y morfología celular.
- Observar otras características útiles para la identificación preliminar de las bacterias como:
  - a- Tamaño y forma de las células bacterianas.
  - b- Disposición de las células bacterianas.
  - c- Presencia de estructuras específicas (esporos, gránulos metacromáticos, etc.).
- Repique de la/s colonia/s aisladas a agar nutritivo (pico de flauta), para continuar con las pruebas de identificación.



## TRABAJO PRÁCTICO 6

### IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

#### OBJETIVO

- *Aproximar la tipificación fenotípica de bacterias aeróbicas o facultativamente anaeróbicas comunes mediante la realización de pruebas bioquímicas.*

### INTRODUCCIÓN

La identificación bacteriana aproximada se efectúa observando las características de las colonias y la morfología en la coloración de Gram. No obstante, la caracterización final en género y especie de un aislamiento bacteriano desconocido se logra usualmente mediante la detección de ciertos sistemas enzimáticos exclusivos y por los productos formados por su metabolismo, que sirven como marcadores o como taxones para la identificación. En el laboratorio estos sistemas enzimáticos pueden detectarse sembrando una pequeña porción de una colonia bien aislada a una serie de medios cultivos que contienen sustratos específicos e indicadores químicos que detectan cambios de pH o la presencia de subproductos específicos. El microbiólogo debe seleccionar el conjunto apropiado de características requeridas para la identificación de cada grupo de bacterias. Ver cuadros 6.1 y 6.2.

Para la identificación final de las bacterias, dentro de un grupo determinado, existen varias decenas de marcadores. El cuadro 6.1 enumera los marcadores seleccionados de uso más frecuente para la identificación de bacilos Gram (-), y el cuadro 6.2 para cocos Gram (+).

Se describen a continuación algunas pruebas **remitiéndose al alumno al uso de la bibliografía** para completar el estudio de pruebas bioquímicas para tipificación bacteriana.

OXIDASA	
UTILIZACIÓN DE GLUCOSA (TSI: Agar triple azúcar hierro)	
FERMENTADORES (Ej: <i>Enterobacteriaceae</i> )	NO FERMENTADORES (Ej.: <i>Pseudomonas</i> , otros bacilos G (-))
Pruebas de identificación	Pruebas de identificación
IMViC: Indol - Rojo de metilo - Voges Proskauer - Citrato SIM: Sulfhidrido - Indol - Movilidad Urea Fenilalanina-desaminasa O-F: Oxidación-fermentación Fermentación de Hidratos de Carbono ONPG Otros: DNasa; Decarboxilasas; etc.	Producción de pigmentos Indol Citrato Movilidad Crecimiento en Mc Conkey Decarboxilasas Catalasa DNasa

Cuadro N° 6.1: Pruebas bioquímicas utilizadas para *bacilos gram negativos aeróbicos*.

## PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA BACILOS GRAM (-)

### PRUEBA DE LA OXIDASA

*Está basada en la detección de la presencia o ausencia de la producción de la enzima citocromo oxidasa.* Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia, en la cadena respiratoria, de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido con el oxígeno molecular el que, a su vez, actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Este sistema se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos.

La prueba de la oxidasa utiliza ciertos colorantes reactivos, como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, que actúan como aceptores artificiales de electrones, sustituyendo al oxígeno, cambiando de color.

La prueba se lleva a cabo por cualquiera de los dos métodos:

#### Técnica directa en placa

En la cual se añaden directamente 2 o 3 gotas del reactivo a las colonias bacterianas aisladas que se desarrollan en placas.

#### Técnica indirecta en tiras de papel

En la que se añaden unas gotas de reactivo a una tira de papel de filtro. En esta zona se extiende un asa de la colonia sospechosa.

Se recomienda el empleo de un *ansa o aguja de inoculación de platino* para retirar las colonias ya que la presencia de un simple vestigio de hierro puede **por sí sólo** catalizar la oxidación del reactivo, dando una reacción falsamente positiva.

#### Interpretación:

Oxidasa (+) = intenso color azul.

Oxidasa (-) = incolora.

Se recomienda el derivado tetrametílico de la p-fenilendiamina, ya que es más estable, más sensible y menos tóxico que el derivado dimetílico, pero más costoso.

#### TSI: (AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO)

##### o KIA (agar hierro de kliger)

La detección de fermentadores de glucosa y lactosa (cuadro 7.1) se utiliza para orientar en la identificación inicial de los bacilos de Gram (-), en especial de los miembros de la familia Enterobacteriaceae.

El agar hierro triplemente azucarado (TSI) o el agar hierro de Kliger (KIA), son medios diferenciales en tubo que sirven a un doble fin:

- 1)- Determinación de las fermentaciones de lactosa y glucosa con producción de ácidos y gases.
- 2)- Determinación de la producción de sulfhídrico.

Ambos medios son muy ricos desde el punto de vista nutritivo porque tienen cuatro componentes proteicos y están exentos de inhibidores, lo que permite el desarrollo de la mayoría de las especies bacterianas.

El medio KIA contiene dos hidratos de carbono: lactosa al 1% y glucosa al 0,1%, mientras que el TSI contiene además 1% de sacarosa. Dado que el pH final del medio está estabilizado a 7,4 y posee como indicador rojo fenol, la producción de pequeñas cantidades de ácido, debido a la fermentación de los carbohidratos, dará como resultado un cambio visible de color, amarillo (pH menor a 6,8) y rojo (pH 7,4).

Como indicador del ácido sulfhídrico el medio contiene sulfato ferroso, que es algo menos sensible que otras sales férricas o ferrosas, lo que hace que pueda haber discrepancias entre las lecturas de sulfhídrico de KIA y TSI y otros medios (como el SIM). Debemos recordar que el medio contiene tiosulfato de sodio para la producción del sulfhídrico.

**PROCEDIMIENTO:**

Se prepara el agar en pico de flauta, esto permite la existencia de dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada, expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción, llamada fondo o profundidad, está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al preparar los medios es importante que el pico y el fondo tengan aproximadamente 3 cm de longitud cada uno, a fin de conservar este efecto de las dos cámaras.

La colonia sospechosa en estudio, y aislada en una placa de agar, se siembra con un ansa recta en los tubos de TSI atravesando el medio hasta la parte profunda del tubo. Es importante no extender la línea de siembra a más de 3 a 5 mm del fondo del tubo para evitar la entrada de aire en la parte profunda y alterar el medio anaerobio. Luego de retirar el alambre del fondo se estría el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Luego se incuba a 35°C durante 18 a 24 hs.

**PRECAUCIONES:**

Es fundamental leer e interpretar un tubo de TSI dentro del período de incubación de 18 a 24 hs. Si se lee antes, por ejemplo a las 12 hs, puede obtenerse un resultado falsamente positivo de ácido/ácido, debido a que la glucosa aún no se ha degradado completamente. Erróneamente se interpretaría que el microorganismo fermenta glucosa y lactosa. Por otra parte, un tubo de TSI leído después de 24 hs puede dar un falso de alcalino/alcalino, que indicaría que no se ha fermentado ningún hidrato de carbono. Ocurre que el microorganismo comienza a utilizar las peptonas como elementos nutritivos para continuar su reproducción, lo que da un pH alcalino.

**INTERPRETACIÓN:**

Según el comportamiento de las bacterias que desarrollan en estos medios, se producen distintos tipos de reacciones (Fig. 7.1).

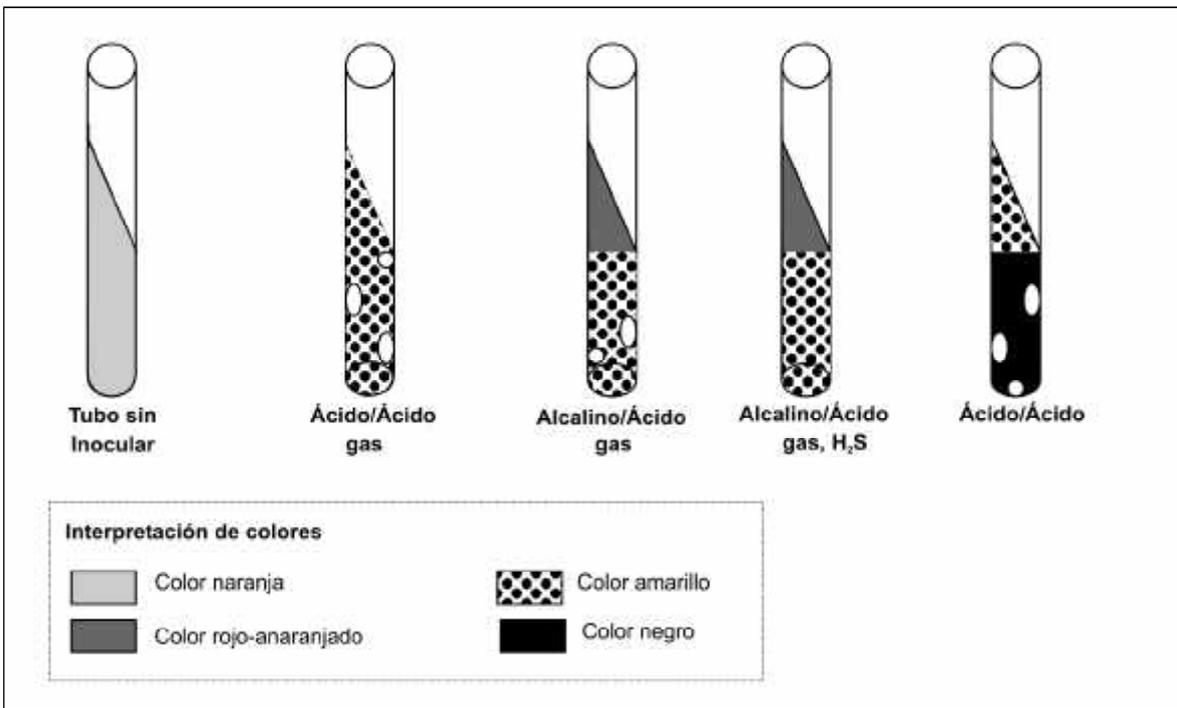


Figura 7.1: Observación de resultados típicos en tubos de TSI.

Se analizan los resultados, registrando primero el cambio de reacción del pico de flauta y luego el de la capa profunda, como se indica a continuación:

PICO DE FLAUTA	CAPA PROFUNDA	HIDRATO DE CARBONO METABOLIZADO
Alcalino	Ácido	Glucosa
Ácido	Ácido	Glucosa + Lactosa
Alcalino	Alcalino	No son atacadas Glucosa ni Lactosa. Utilizan peptonas del medio de cultivo.
Alcalino	Sin cambio	No son atacadas Glucosa ni Lactosa. Utilizan peptonas del medio de cultivo.

*Nota:* en todos los casos debe observarse si hay producción de gas y de sulfuro.

**Fermentación de glucosa solamente (Alcalino/Ácido):** Esta reacción (alcalina/ácida) se da en los microorganismos capaces de fermentar solamente la glucosa; no son fermentadores de lactosa. La zona superior del pico de flauta se acidifica (amarilla) en las primeras horas de desarrollo, lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa. Después de 18 a 24 hs de incubación la baja concentración de glucosa (0,1 %) ha sido consumida por completo y el microorganismo comienza a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio para obtener los nutrientes para su crecimiento, y este catabolismo de la peptona produce la liberación de amoníaco, dando un pH alcalino con el rojo fenol.

En la capa profunda del medio se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa, que ocurre después de 18 a 24 hs de incubación, dando un pH ácido (color amarillo), debido a los productos terminales ácidos que se forman.

Ejemplo de bacterias no fermentadoras de lactosa (y/o sacarosa) *Shigella spp.*

**Fermentación de lactosa y glucosa (Ácido/Ácido):** Esta reacción (ácida/ácida) se da en los microorganismos que fermentan tanto la lactosa como la glucosa en busca de elementos nutritivos, dando después de 18 a 24 hs de incubación una reacción ácida (amarilla) en el pico de flauta y también en zona profunda del tubo. La concentración de lactosa del 1 % (diez veces más que la glucosa) en un período de incubación de 18 a 24 hs, aun no se ha consumido y existe una condición ácida. Si se lee el mismo tubo después de 48 hs, el pico de flauta se vuelve alcalino por depleción de la lactosa y la utilización de las peptonas. Ejemplo de bacterias que fermenten glucosa y lactosa (y/o sacarosa en el TSI), coliformes como *Escherichia coli* y el grupo *Klebsiella-Enterobacter*.

**No fermentación de lactosa ni de glucosa (sin cambio):** Esta reacción (todo rojo), se da cuando los microorganismos no fermentan estos azúcares, por ende no se forman ácidos, y la producción de aminas en el pico, junto con los buffer alcalinos, hacen que todo el medio aparezca de color rojo. Las bacterias que producen este tipo de reacción son conocidas como “no fermentadoras”. Ejemplo característico de bacterias “no fermentadoras” es la *Pseudomonas aeruginosa*.

Estas bacterias, que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, pueden utilizar la peptona aeróbica o anaeróbicamente dando dos posibles reacciones el AHK:

- Alcalina/Alcalina: degradan las peptonas tanto aeróbica como anaeróbicamente.
- Alcalina/Sin cambio: es el resultado de un microorganismo, que solo puede catabolizar las peptonas en condiciones aeróbicas; de allí que solo el pico muestra el cambio de color (rojo).

Cuando se observa el tubo de KIA o TSI para determinar la capacidad de las bacterias para fermentar la glucosa, lactosa y sacarosa, se debe observar la producción de gas como producto final del metabolismo de los hidratos de carbono; que se evidencia por el desplazamiento total o parcial del medio, dejando un área clara o una muesca, al costado del tubo o a veces burbujas.

También debe observarse la producción de sulfhídrico, que ennegrece el medio y a veces oculta la acidez de la capa superior del medio que, aunque no se la observe, existe cuando se produce sulfhídrico.

## PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO

Algunas bacterias son capaces de liberar enzimáticamente azufre en forma de ácido sulfhídrico a partir de aminoácidos o de agentes azufrados presentes en el medio de cultivo. *El sulfhídrico es un gas incoloro que puede detectarse utilizando un indicador de sulfuro, que son sales de metales pesados tales como sulfato ferroso, citrato férrico, acetato de plomo, etc., que en contacto con el sulfhídrico gaseoso, dan un precipitado negro (Azufre del metal pesado) indicando la positividad de la reacción.*

El indicador más sensible es el acetato de plomo, que, como suele inhibir el desarrollo de muchas bacterias, se lo utiliza impregnado en una tira de papel de filtro que se fija al tapón del tubo de cultivo, y no se incorpora al medio. El punto final lo da el ennegrecimiento de la tira que se detecta a las 24 a 48 hs. Puede detectarse el sulfhídrico en medios de cultivo como el SIM, TSI, KIA y no en papeles reactivos. La diferente sensibilidad de estos medios radica en la alteración de las distintas etapas que conducen a la producción y detección del sulfhídrico. El gas sulfhídrico que se detecta en un medio puede no detectarse en otro, por lo tanto es necesario conocer el sistema analítico utilizado cuando se interpretan esquemas de identificación.

El medio SIM es más sensible que el KIA para la detección del sulfhídrico y, a su vez, el medio KIA es más sensible que el TSI. En todos los casos el punto final está dado por un precipitado negro insoluble de sulfuro del metal pesado formado en el medio.

## IMViC

El IMViC es una sigla que agrupa 4 pruebas mínimas de identificación para enterobacterias que son los bacilos gram (-) de aislamiento más frecuente en la clínica y la industria. Estas pruebas son:

**I- Indol (descrito en SIM).**

**M – Rojo de Metilo.**

**V – Voges Proskauer.**

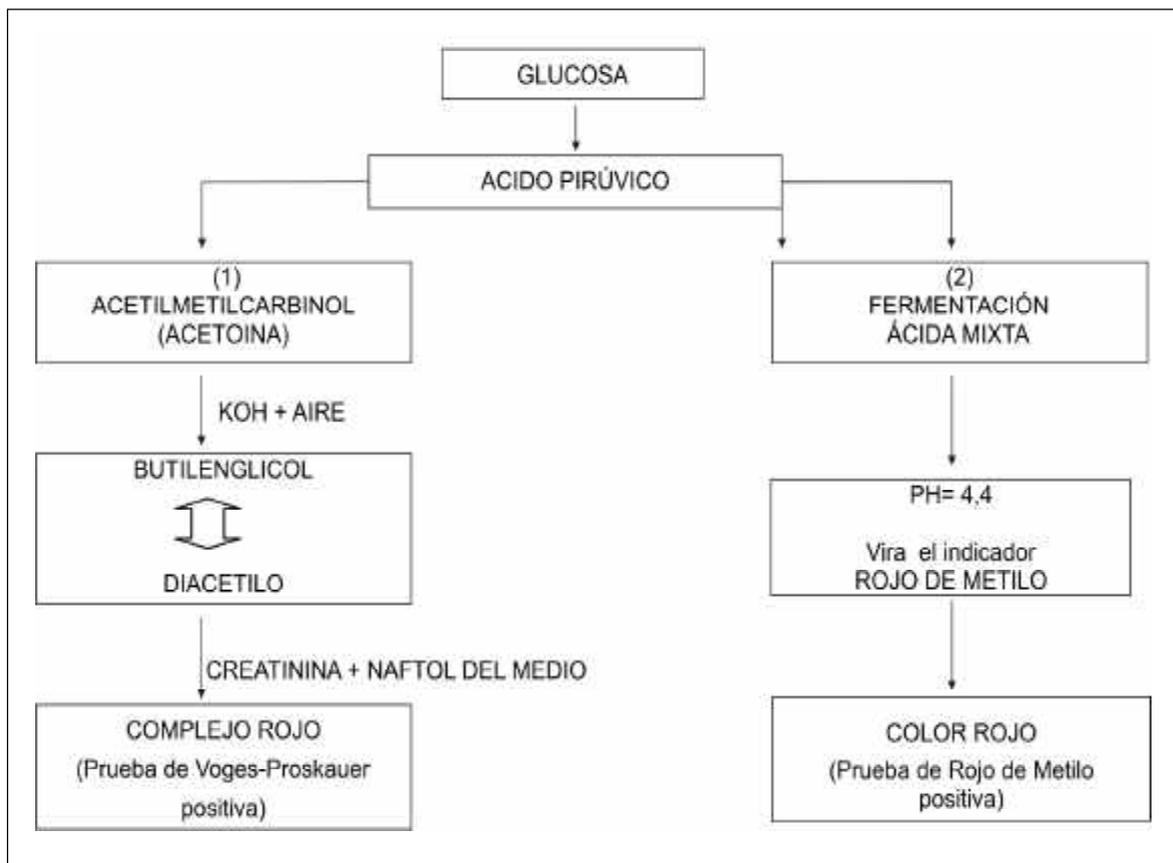
**iC - Citrato.**

## PRUEBA DEL ROJO METILO

Una vez metabolizada la glucosa hasta ácido pirúvico, los microorganismos siguen distintas rutas fermentativas, dando productos variados que se tratan de identificar para caracterizar el género o la especie microbiana correspondiente. Dos de esas rutas o vías degradativas son:

**La fermentación ácida mixta**

Butilenglicol.



La prueba de rojo de metilo (RM) sirve para identificar especies bacterianas que son grandes productores de ácidos orgánicos fuertes (láctico, acético, fórmico) a partir de glucosa, por la vía de fermentación ácida mixta.

El rojo de metilo es un indicador de pH que vira entre 6 (amarillo) y 4,4 (rojo).

Existen muchas especies de enterobacterias que producen mezclas de ácidos fuertes en cantidades detectables con el indicador; solo se consideran rojo de metilo (+) aquellos microorganismos que pueden mantener este pH bajo luego de una incubación prolongada (2 a 5 días) y no en las fases iniciales de la incubación, contrarrestando así al sistema estabilizado de pH del medio.

El medio usado es el caldo RM/VP según la fórmula de Clark y Lubs, que también sirve para Voges-Proskauer (VP). El medio contiene glucosa, un buffer estabilizador de pH y nutrientes.

**Procedimiento:**

1. Se siembra el caldo RM/VP con un cultivo puro del microorganismo en estudio.
2. Se incuba a 35°C durante 48 hs (no menos) y hasta 5 días.
3. Finalizado este período se divide en 2 fracciones: una de ellas (A) para la prueba de RM y la otra (B) para el VP.
4. A la fracción (A) se le añaden 2 a 5 gotas del indicador rojo de metilo.
5. El desarrollo de un color rojo indica que la reacción es positiva, por lo tanto la producción de ácido es suficiente para bajar el pH a 4,4 o menos.
6. Color amarillo indica que la reacción es negativa.

**PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER**

Se utiliza para detectar aquellos microorganismos que metabolizan el ácido pirúvico por la vía que lleva a la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol), un subproducto de reacción neutra.

A la alícuota (B) del caldo RM/VP separado anteriormente se agregan los siguientes reactivos respetando el orden:

- a) 0,6 ml. de alfa-naftol al 5%.
- b) 0,2 ml. de KOH al 40%.

Agitar suavemente el tubo para poner en contacto con el oxígeno atmosférico en medio alcalino y se deja reposar entre 10-15 minutos; luego se observa.

El desarrollo de un color rojo indica reacción positiva por presencia de diacetilo.

Un color amarillo indica reacción negativa.

## UTILIZACIÓN DEL CITRATO

*Identifica a aquellas bacterias que pueden obtener energía y/o carbono por vía distinta de la fermentación de hidratos de carbono, utilizando citrato como única fuente de carbono.* El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico (metabolito del ciclo de Krebs).

El medio utilizado no debe tener proteínas ni hidratos de carbono. Incluye citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato, también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, produciendo amoníaco que se convierte en ( $\text{NO}_4\text{OH}$ ) alcalinizando el medio.

Para la realización de esta prueba pueden utilizarse distintos medios citratados:

### 1. Medio citratado de Koser:

Consiste en un caldo con fosfatos y citrato de sodio, libre de proteínas e hidratos de carbono, en el que el punto final de la prueba lo da la presencia o ausencia de turbidez visible tras la inoculación e incubación del microorganismo en estudio.

### 2. Medio citratado de Simmons:

Al caldo de Koser se le agrega agar y azul de bromotimol, con lo cual el punto final es un cambio de color visible en el medio.

### Procedimiento:

Se vierte el medio citratado de Simmons en un tubo y se deja solidificar en pico de flauta. Se estría la superficie del pico con un inóculo escaso tomado de una colonia aislada del microorganismo. Si el inóculo es muy abundante, los compuestos orgánicos preformados dentro de las paredes celulares de las bacterias que van muriendo pueden liberar carbono y nitrógeno como para producirse falsos (+). Cuando se están inoculando distintos tubos con distintos medios diferenciales conviene primero estriar el medio de citrato para evitar arrastrar proteínas e hidratos de carbono de los otros medios.

Luego de incubar a 35°C durante 24 a 48 hs (hasta 4 días), el desarrollo bacteriano y el color azul intenso indican que la prueba es positiva y revela que el microorganismo ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con la formación de productos alcalinos.

A veces puede detectarse un desarrollo microbiano visible a lo largo de la estría, antes del viraje del color al azul. Esto puede interpretarse como positivo y se confirma prolongando el tiempo de incubación hasta el desarrollo de color azul.

## SIM

El SIM es un medio de cultivo semisólido que se utiliza para la detección de:  
Sulfhidrilo (ver descripción de producción ácido sulfhídrico, pág 79).

Indol.

Movilidad.

## INDOL

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano, que está presente en la peptona que compone el medio de cultivo. *Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de degradar el triptófano, con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.*

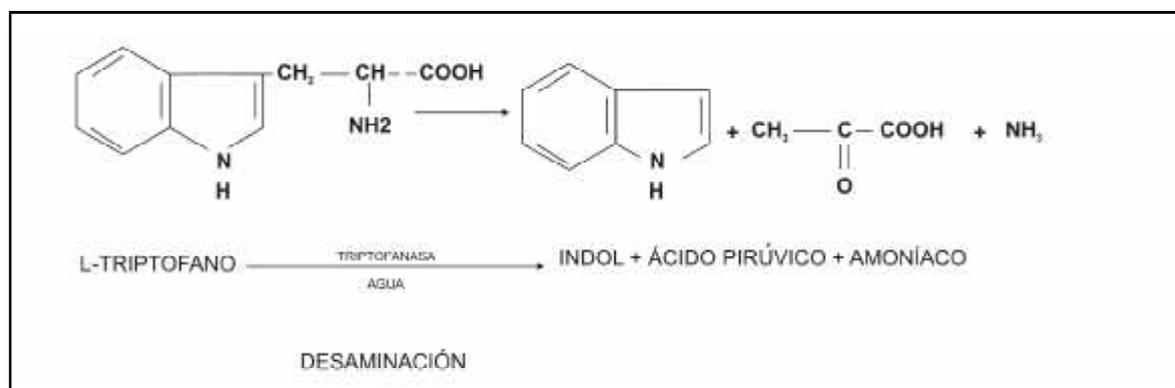
### Procedimiento:

Se siembra el microorganismo en estudio en un tubo conteniendo medio líquido de cultivo formado por peptona al 1%, ClNa y es una variante posible incorporarle triptófano al 1%. Se deben utilizar medios ricos en triptófano.

Se pueden emplear medios combinados tales como el SIM (sulfuro, indol, movilidad) o indol-nitrato. Se inocula el medio con el organismo en estudio e incuba a 35°C durante 24 a 48 hs.

La presencia de indol al cabo de la incubación se revela por el agregado de un reactivo que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (reactivos de Ehrlich o de Kovac).

Si la prueba es positiva, el indol se combina con el aldehído para dar un color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo (o en la capa de cloroformo si se emplea el reactivo de Ehrlich) segundos después de añadido.



## PRUEBA DE LA MOTILIDAD

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, los cuales se encuentran en los bacilos. A veces las bacterias con motilidad producen variantes no móviles.

### Procedimiento:

Se usan medios semisólidos para detectar la movilidad. Existen medios comerciales como BAM y SIM que determinan otras características además de la movilidad.

Los medios se fraccionan en tubos, hasta alcanzar una altura de 5 cm. y se dejan solidificar en posición vertical. El microorganismo se inocula punzando una vez el centro del medio, con un alambre recto hasta una profundidad de 2 cm. Se incubará 24 hs a 37°C a temperatura ambiente según el microorganismo en estudio.

### Interpretación:

Prueba positiva: Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio.

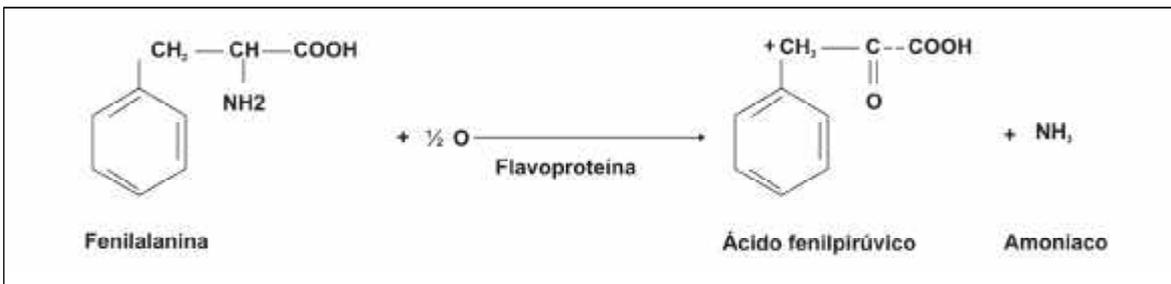
Prueba negativa: Crecimiento bacteriano únicamente en la línea de siembra. (Fig. 6.2).

## PRUEBA DE LA FENILALANINA DESAMINASA

Algunos microorganismos poseen la facultad de desaminar la fenilalanina con producción de ácido fenil pirúvico y amoníaco. (Ver reacción).

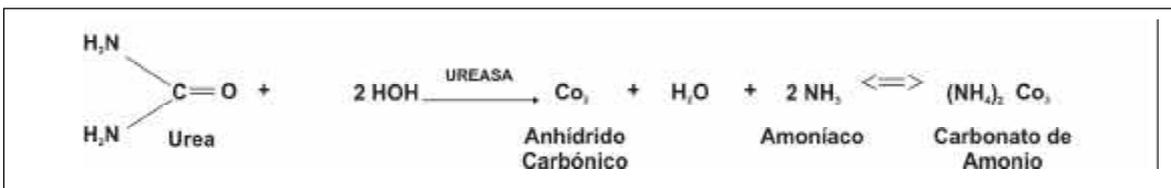
**Procedimiento:**

Se siembra el microorganismo en un medio de cultivo en “pico de flauta” conteniendo fenilalanina, extracto de levadura, ClNa, fosfato de amonio, agar y agua destilada. Se incuba a 35°C durante 18 a 24 hs. Se agrega directamente 4 o 5 gotas de reactivo (cloruro de hierro) al 10 % directamente sobre la superficie del agar. Si la reacción es positiva, se observa inmediatamente la aparición de un color verde intenso en el pico de flauta y en el líquido de sinéresis. Algunas especies desaminan la fenilalanina tan rápidamente que la prueba puede ser positiva ya a las 4 hs de incubación. La coloración se desvanece en unos 10 minutos, en consecuencia, la observación debe realizarse inmediatamente después de agregar el reactivo.



**REACCIÓN DE LA UREASA**

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa tienen la capacidad de hidrolizar urea con liberación de amoníaco.



El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciéndose una alcalinización y un aumento de pH del medio.

**Procedimiento:**

Se siembra el microorganismo en un medio conteniendo urea al 20% y un indicador de pH, el rojo fenol, incoloro a pH neutro y rojo a pH alcalino. El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los dos medios más utilizados comúnmente.

Incubar ambos medios a 35°C durante 18 a 24 hs. Una reacción positiva se pone de manifiesto por el cambio de color. El caldo de Stuart está fuertemente estabilizado con sales de fosfato a un pH de 6,8. El organismo en estudio debe producir cantidades relativamente grandes de amoníaco a fin de superar el sistema estabilizador y elevar el pH del medio lo suficiente como para provocar el viraje del indicador.

El agar urea de Christensen posee un sistema estabilizador de pH mucho más débil y contiene además peptonas y glucosa. Este medio promueve el crecimiento de muchas especies bacterianas que no pueden desarrollarse en el caldo de Stuart, y la menor capacidad del buffer permite detectar producciones más escasas de amoníaco.

**OTRAS PRUEBAS PARA BACILOS GRAM (-)**

**PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN (OF)**

Los microorganismos sacarolíticos degradan glucosa fermentativamente u oxidativamente. Los subproductos de la fermentación son “ácidos mixtos” relativamente fuertes que se pueden detectar en medio de fermentación convencional.

En cambio, los ácidos formados por degradación oxidativa son sumamente débiles y para su detección se requiere un medio óxido-fermentación más sensible, como el Hugh y Leifson.

Este medio tiene una concentración aumentada de glucosa y un indicador de pH.

Se requieren dos tubos para prueba OF, sembrado con el microorganismo desconocido empleando una aguja de punción que atraviese el medio hasta llegar casi al fondo del tubo.

Cubrir el tubo con una capa de 1 cm. de parafina estéril fundida, dejando el otro tubo abierto al aire. Incubar ambos tubos a 35°C durante 48 hs o más.

**Interpretación:**

TUBO ABIERTO	TUBO CUBIERTO	TIPO DE METABOLISMO
Ácida (amarillo)	Alcalina (verde)	Oxidativo
Ácida (amarillo)	Ácida (amarillo)	Fermentativo
Alcalina (verde)	Alcalina (verde)	No sacarolítico o Inactivo

**PRUEBA DEL ONPG PARA LA DETECCIÓN DE B-GALACTOSIDASA**

El ortonitrofenilgalactósido (ONPG) es un compuesto similar a la lactosa, excepto en que la glucosa ha sido sustituida por un radical ortonitrofenilo.

*Esta prueba permite la detección de la enzima B-galactosidasa mucho más rápidamente que la prueba de fermentación de lactosa.* Esto es útil para identificar aquellos organismos fermentadores tardíos de lactosa que son deficientes en B-galactósido permeasa. La pared celular bacteriana es más permeable al ONPG que a la lactosa, y por acción de la B-galactosidasa el ONPG es hidrolizado a galactosa y ortonitrofenol. El medio está estabilizado a un pH alcalino, de modo que el nitrofenol liberado se puede detectar por un cambio visible del color del medio al amarillo claro.

Se carga un ansa con bacterias desarrolladas y se emulsiona en 0,5 ml de solución de fisiológica hasta producir una suspensión abundante, añadir a la suspensión un disco de ONPG. Incubar a 37°C. Leer a las 48 hs. Si es negativo dejar 24 hs. (Fig. 6.4)

Interpretación:

ONPG (+) = color amarillo

ONPG (-) = incoloro

**FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO**

Se determina la capacidad de un microorganismo de fermentar un determinado hidrato de carbono incorporado a un medio de cultivo básico, con producción de ácido o ácido y gas.

El medio de cultivo lleva incorporado un indicador de pH, generalmente púrpura de bromocresol, que a un pH neutro es violeta y a un pH ácido es amarillo.

La fermentación del compuesto original y la consiguiente formación de productos ácidos provoca un viraje del indicador que marca así la positividad del ensayo.

Cuando se utiliza un medio de caldo con hidratos de carbono se coloca, por lo general, un tubo de Durham en posición invertida, en el tubo de glucosa únicamente. Si un microorganismo es capaz de producir gas en la glucosa, entonces también se producirá gas en los otros hidratos de carbono utilizados. No obstante, si se conoce que el microorganismo en estudio no fermenta la glucosa, es aconsejable agregar tubos de Durham a algunos de los otros hidratos de carbono puestos a prueba en la batería.

**IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LAS BACTERIAS**

Se utiliza una reacción de aglutinación directa entre la célula bacteriana y un antisuero específico. Se aplica con mayor frecuencia con las siguientes bacterias: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Streptococcus betahemolíticos*.

- 1- Colocar sobre un portaobjetos limpio y desengrasado una gota de solución fisiológica.
- 2- Con ayuda de un ansa de anillo previamente esterilizada y enfriada levantar una colonia desde el medio de cultivo.
- 3- Suspender la colonia en la gota de solución fisiológica con movimientos giratorios sin extenderla sobre el portaobjetos.
- 4- Agregar sobre la suspensión una gota de antisuero específico a estudiar.
- 5- Mezclar con ayuda de una varilla plástica o el ángulo de un cubreobjetos.
- 6- Balancear suavemente el portaobjetos durante un minuto.
- 7- Observar la presencia o ausencia de aglutinación.

**PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA COCOS GRAM (+)**

CATALASA		
(+)		(-)
FAMILIA <i>Micrococcaceae</i>		FAMILIA <i>Streptococcaceae</i>
Fermentación de la Glucosa (TSI)		
(-) <i>Micrococcus</i>	(+) <i>Staphylococcus</i>	Hemólisis Sensibilidad a Bacitracina Sensibilidad a Vancomicina Test de CAMP Hidrólisis de Hipurato Bilis esculina Solubilidad en bilis Prueba de la Optoquina Desarrollo en CINA al 6,5%
	Coagulasa Voges-Proskauer ONPG Producción de pigmentos Urea Sensibilidad Novobiocina Fermentación de azúcares Hemólisis DNasa	

*Cuadro N° 6.2: Cocos gram (+) pruebas bioquímicas marcadoras para la identificación de los microorganismos más comunes.*

**PRUEBA DE LA CATALASA**

Es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno, desprendiendo oxígeno. La poseen muchos microorganismos aerobios y anaerobios facultativos excepto los estreptococos.

Esta prueba se lleva a cabo en portaobjetos o en tubos, y es comúnmente utilizada para diferenciar estafilococos de estreptococos, donde la prueba puede ser positiva y negativa respectivamente. También se utiliza en la diferenciación de especies de bacilos Gram (+) y micobacterias; en este último caso puede hacerse cuantitativa o semicuantitativa.

**Prueba en portaobjeto:**

2. Con un ansa aguja transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos.

3. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Se recomienda no añadir el microorganismo al reactivo (invirtiendo), especialmente si se utilizan ansas que contienen hierro, ya que se pueden producir falsos positivos.

**Método en tubos o placas de agar:**

1. Diluir 1:10 el peróxido de hidrógeno al 30% en agua destilada para obtener una solución al 3%.
2. Añadir unas gotas del peróxido de hidrógeno directamente sobre la superficie del desarrollo de una placa o pico de agar.

**INTERPRETACIÓN:**

La rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.

**PRODUCCIÓN DE COAGULASA**

*El S. aureus es identificado sobre la base de la presencia de la enzima coagulasa. La coagulasa se halla presente en dos formas, “fija o ligada” y “libre” cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas:*

1. Prueba en portaobjetos: detecta la **Coagulasa fija** conocida como “factor de aglutinación”, está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos. La actividad de la coagulasa fija no es inhibida por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre.

**Procedimiento:**

Se siembran dos tubos de caldo nutritivo (puede emplearse también agar nutritivo) uno con una cepa de *Staphylococcus coagulasa (+)* positiva, como control y el otro con la colonia sospechosa; se incuban a 37°C por 18 a 24 hs. Al cabo de ese tiempo se pone una suspensión espesa de cada tubo en los extremos de un portaobjeto y se agrega una gota de plasma a ambas suspensiones y se mezcla suavemente. Si se han empleado colonias del agar nutritivo hacer la suspensión con solución fisiológica mezclando suavemente y agregar la gota de plasma; mezclar.

En caso positivo, se observa la inmediata formación de un precipitado macroscópico en forma de aglutinados blancos en el control y en el problema. La prueba es negativa si se observa aglutinado en el control y no hay aglutinación en el problema.

2. Prueba en tubos. Detecta la **coagulasa libre** que es la trombina, presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

**Procedimiento:**

Se lleva a cabo sembrando en 0,5 ml de plasma humano o de conejo con un ansa que contenga abundante material de colonia sospechosa o con 0,3 ml de suspensión bacteriana en estudio realizada en solución fisiológica; se agita el tubo suavemente para lograr la suspensión y se coloca en baño de agua a 37°C. Igual procedimiento se realiza con la cepa de *Staphylococcus aureus coagulasa (+)* positiva. La lectura de ambos tubos se realiza cada 30 minutos en el lapso de 1 a 4 hs, inclinando suavemente los tubos. Las cepas coagulasa (+) producen un coágulo visible en ese tiempo. Caso contrario dejar 24 hs y leer. Las cepas coagulasa (-) no producen coágulo, lo que las diferencia del control. (Fig. 6.3).

**PRUEBA DE BILIS-ESCULINA**

Se siembra el microorganismo en estudio en un pico de flauta que contiene el medio de Bilis-Esculina, se incuba a 37°C por 24 hs y se lee.

La prueba depende de la capacidad del microorganismo de desarrollar en presencia de bilis al 4% y de hidrolizar la esculina, tiñendo de marrón oscuro el medio de bilis-esculina que contiene citrato férrico como fuente de iones férricos.

**Interpretación:**

La esculina, siendo hidrosoluble, difunde hacia el medio agar. La reacción es positiva si se observa un ennegrecimiento difuso del pico de flauta.

**PRUEBA DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA OPTOQUINA, BACITRACINA Y NOVOBIOCINA**

Para esta prueba se emplea papel de filtro impregnado con optoquina (bacitracina o novobiocina), colocado directamente sobre la superficie de agar sangre sembrada con bacterias. Las células bacterianas expuestas al antibiótico difundido en el medio que rodea al disco son lisadas debido a una variación de la tensión superficial, produciéndose una zona de inhibición del desarrollo alrededor del disco.

**Técnica:**

- 1)- Utilizando un ansa, tomar una porción de una colonia bien aislada del microorganismo en estudio y estriar un área de 3 cm. de diámetro de una placa de agar sangre.
- 2)- Colocar un disco de optoquina (bacitracina o novobiocina) en el centro del área estriada. Presionar suavemente el disco con una pinza estéril, de modo que se adhiera a la superficie del agar.
- 3)- Invertir la placa e incubarla a 35°C durante 18 a 24 hs.

**Interpretación:**

Se debe medir el halo de inhibición del desarrollo dependiendo del antibiótico usado:

	SENSIBLE	RESISTENTE
BACITRACINA	> 10 mm	< 10 mm
OPTOQUINA	> 14 mm	< 14 mm
NOVOBIOCINA	> 16 mm	< 16 mm

**HEMÓLISIS**

La producción de hemólisis en agar sangre es una prueba orientativa muy útil para la identificación de cocos Gram (+) catalasa (-). Ver descripción e interpretación en pág 55 y 72.

**CLORURO DE SODIO AL 6,5%**

*Es una prueba que pone de manifiesto la capacidad del microorganismo de desarrollar en medios con elevada concentración de cloruro de sodio. Se emplea en la identificación de Cocos Gram (+) catalasa (-). Ej. Streptococcus spp. El medio se prepara añadiendo 6,5 % de cloruro de sodio a un caldo nutritivo.*

**Procedimiento:**

Se inocula el medio con el microorganismo en estudio y se incuba 24 hs a 35°C.

**Interpretación:**

- CINa (+): El desarrollo del microorganismo se evidencia por un enturbiamiento del medio.
- CINa (-): La ausencia de turbidez.

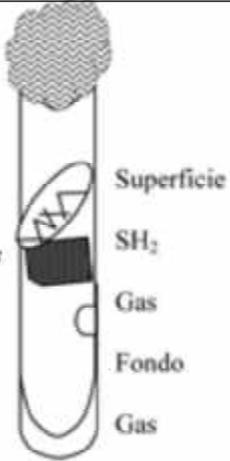
<b>BACILOS GRAM (-)</b>		
<b>PRUEBAS</b>	<b>NEGATIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
Oxidasa	solución incolora	solución fucsia (*)
Triple azúcar hierro (TSI) (Fig 6.1) No fermenta glucosa ni lactosa Fermentación de glucosa Fermentación de glucosa y lactosa Producción de gas Producción de SH <sub>2</sub>	Lectura  fondo sin cambios, pico alcalino fondo amarillo, pico alcalino fondo amarillo, pico amarillo  sin levantamiento del medio ausencia de color negro en el medio	     con levantamiento ennegrecimiento
Producción de indol	reactivo sin cambios	reactivo vira al fucsia
Rojo de Metilo	sin cambio	rojo en todo el medio
Voges Proskauer	sin cambio	halo rojo en superficie
Utilización de citrato	medio verde	medio azul
Motilidad (Fig 6.2)	crecimiento en el sitio de punción	crecimiento en todo el medio
Fenilalanina	sin cambio	verde en superficie
Producción de ureasa	medio amarillo	medio fucsia
Fermentación de glucosa (fig 6.4)	medio color verde	medio color amarillo

<b>BACILOS GRAM (+)</b>		
<b>PRUEBAS</b>	<b>NEGATIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
Catalasa	sin burbujeo	con burbujeo
Coagulasa	ausencia de coágulo	presencia de coágulo
Sensibilidad a la bacitracina	sin halo de inhibición	presencia de halo de inhibición
Sensibilidad a la bacitracina	sin halo de inhibición	presencia de halo de inhibición
Sensibilidad a la optoquina	sin halo de inhibición	presencia de halo de inhibición
Hidrólisis de bilis esculina	medio color pardo claro	medio color negro
Crecimiento en CINA 6,5%	caldo límpido	caldo turbio

*Cuadro 6.3. Lectura e interpretación de pruebas bioquímicas.*

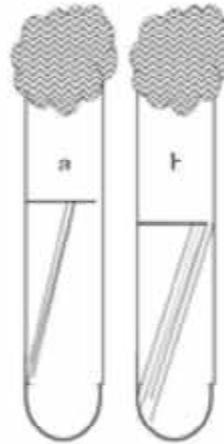
**Figura 6.1**

Tubo con TSI que muestra crecimiento en superficie (estria) y en profundidad (picadura), así como la producción de gas de sulfhídrico.



**Figura 6.2**

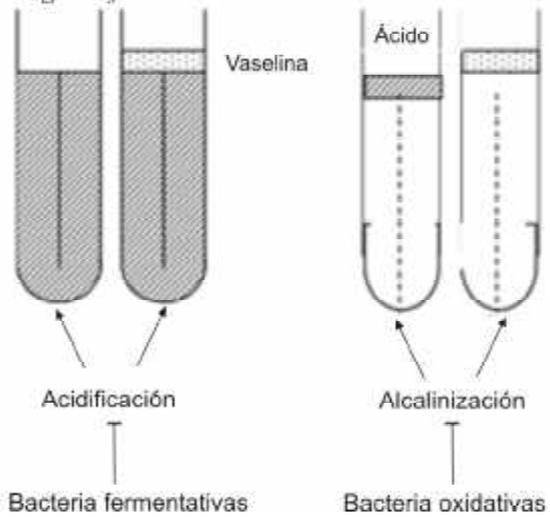
producción de motilidad en agua blando  
a) inmóvil  
b) móvil.



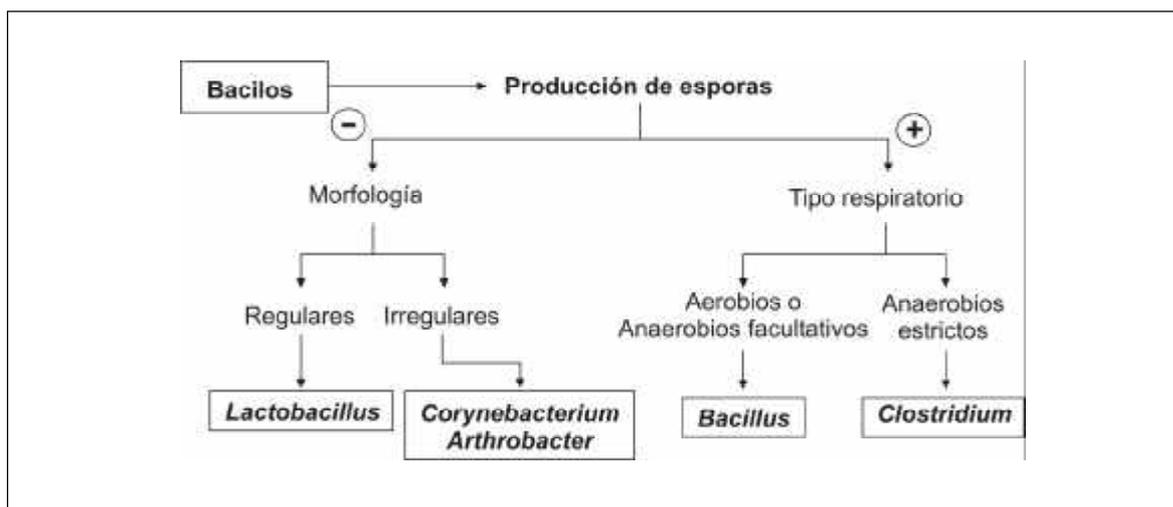
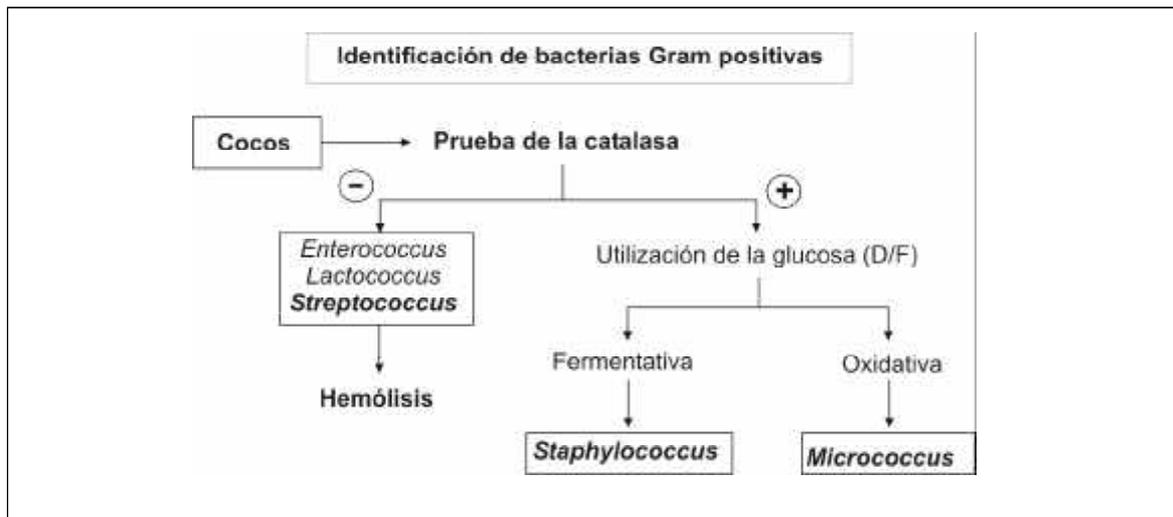
**Figura 6.3:** *S. aureus* producción de coagulasa libre: a) negativo; b) positivo.



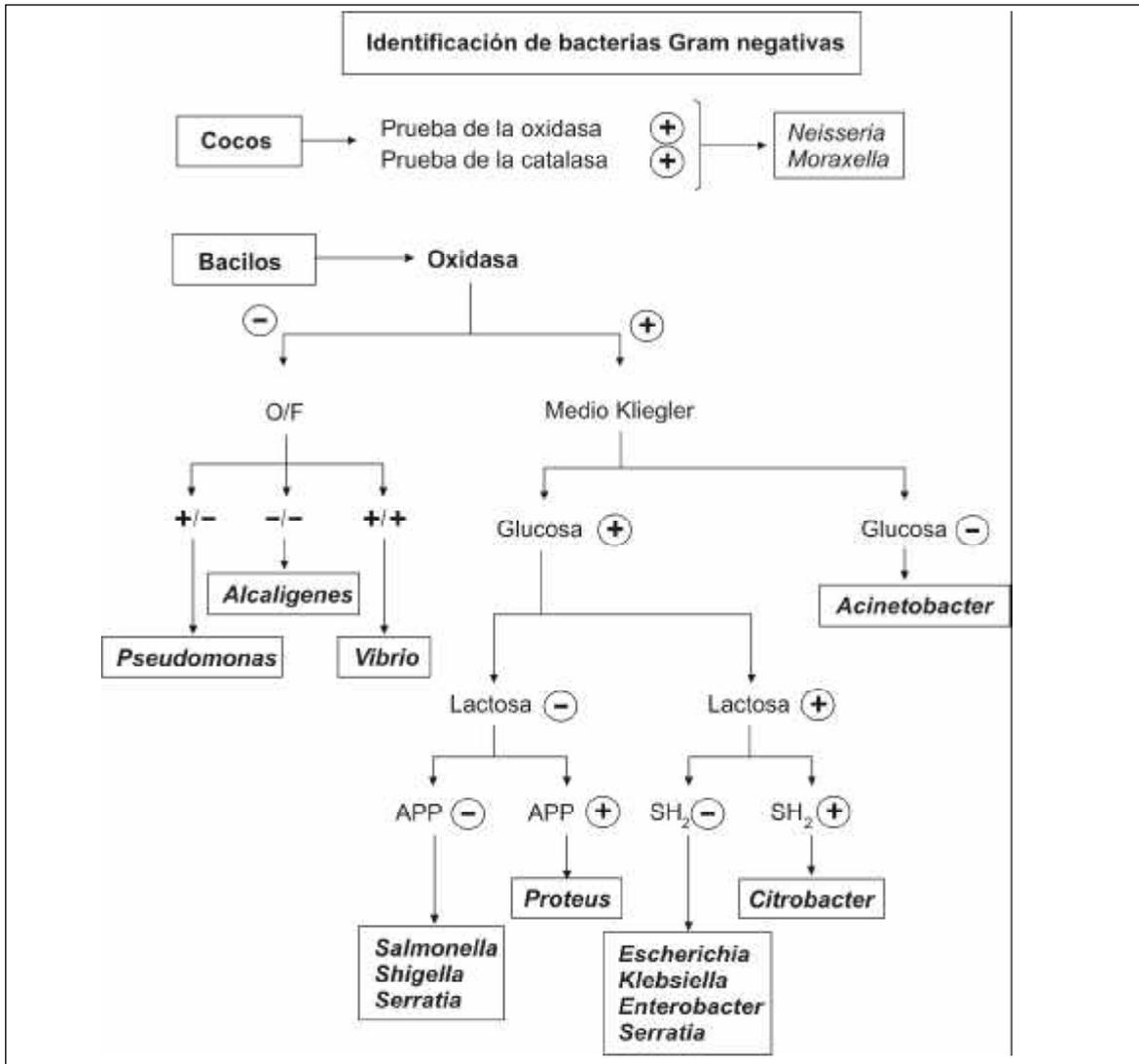
**Figura 6.4:** Pruebas de oxidación-fermentación Hugh-Leifson.



**CLAVES PARA LA IDENTIFICACIÓN BACTERIAS GRAMPOSITIVAS**



**CLAVES PARA LA IDENTIFICACION BACTERIAS GRAMNEGATIVAS**



Interpretacion global de las pruebas de identificación de bacilos Gram negativos fermentadores de glucosa.

	Medio TSI				Movilidad	Fenil alanina	Urea	Indol	RM	VP	Citrato
	Superficie	Fondo	Gas	SH <sub>2</sub>							
<i>Escherichia</i>	A	A	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Citrobacter</i>	A	A	+	V	+	-	+/-	-	+	-	+
<i>Klebsiella</i>	A	A	+	-	-	-	+/-	-/+	V	V	+
<i>Enterobacter</i>	A	A	+	-	+	-	V	-	-	V	+
<i>Serratia</i>	V	A	-/+	-	+	-	-/+	-	V	+	V
<i>Proteus</i>	-	A	-	+	+	+	+	V	+	V	V
<i>Salmonella</i>	-	A	-	V	+	-	-	-	+	-	V
<i>Shigella</i>	-	A	-	-	-	-	-	V	+	-	-

A: Ácido V: Variable, Según las especies.







## TRABAJO PRÁCTICO 7

### SIEMBRA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

#### OBJETIVOS:

- *Trabajar en el laboratorio con diferentes atmósferas de incubación para bacterias.*
- *Sembrar materiales en medios agarizados y líquidos, incubar en atmósferas aeróbica y microaerófila o anaeróbica y comparar resultados.*
- *Discutir ventajas y desventajas del uso de la jarra Gass Pack.*

### INTRODUCCIÓN

Las células bacterianas, al igual que las células de todos los organismos vivos, realizan un trabajo. Para ello requieren una fuente de energía. Es así que, en base a su requerimiento de carbono, pueden dividirse en microorganismos autótrofos y heterótrofos.

En las bacterias los sistemas que transforman la energía química y radiante en una forma biológicamente útil, incluyen la RESPIRACIÓN, la FERMENTACIÓN y la FOTOSÍNTESIS. Estos aspectos ya fueron considerados en la guía de trabajos prácticos de la cátedra “Medios de Cultivo”.

Muchos de los microorganismos que realizan procesos fermentativos, son anaerobios obligados y otros son anaerobios facultativos.

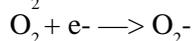
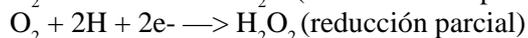
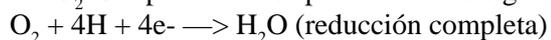
Recordemos que la respiración es un proceso en el que el  $O_2$  sirve habitualmente como aceptor final de electrones, en este caso se habla de respiración aerobia, en el caso de respiración anaerobia, se emplea un compuesto inorgánico tal como nitrito, sulfato o carbonato.

La fermentación es un proceso menos eficiente que la respiración para extraer energía. Cuando los microorganismos oxidan la glucosa se libera toda la energía disponible en la molécula de glucosa.

Entre los microorganismos que presentan respiración aerobia se encuentran los aerobios obligados y los anaerobios facultativos. Además, algunos de los anaerobios facultativos pueden emplear nitrato como aceptor final de electrones.

Sin embargo los que emplean sulfato o carbonato como aceptor de electrones en una respiración anaerobia, son anaerobios obligados.

Si bien el  $O_2$  es potencialmente tóxico para cualquier forma de vida, los anaerobios son intolerantes al mismo aunque en diferentes grados. Existe un espectro que va desde los extremadamente intolerantes (aerointolerantes) hasta los aerotolerantes moderados los cuales pueden sobrevivir a la presencia de  $O_2$  durante breves períodos. Varias son las causas de la toxicidad del Oxígeno. En primer lugar el Oxígeno es un poderoso oxidante, es decir, un ávido receptor de electrones, por lo tanto su presencia en solución es incompatible con potenciales REDOX bajos. En esta situación el flujo de electrones se ve interferido por un receptor extraño al usual de los gérmenes provocando *shunts* letales. En segundo lugar el Oxígeno puede interactuar directamente con enzimas o cofactores causando inactivaciones irreversibles. En tercer lugar, y aparentemente, la causa más importante de la toxicidad, se atribuye a la producción de sustancias tóxicas derivadas de la reducción parcial de la molécula  $O_2$ . Simplificando se pueden dar las siguientes reacciones químicas:



La formación de Peróxidos de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede ser catalizada por varias enzimas y su letalidad para las bacterias está fehacientemente comprobada. Por otra parte el anión Superóxido ( $O_2^-$ ) es altamente tóxico por su participación en la producción de hidróxilos libres ( $HO^-$ ) agentes letales

para los microorganismos. Aquellos anaerobios aerotolerantes poseen enzimas como Catalasas y peroxidasas que descomponen los  $H_2O_2$  en  $H_2O + O$ ; otros poseen Superóxido-dismutasas (SOD) que actúan eliminando los  $O_2^-$ ; más aun las SOD han sido postuladas como factores de virulencia en los anaerobios ya que estas enzimas permitirían la sobrevivencia de las bacterias en tejidos oxigenados hasta que el consumo de Oxígeno creará el ambiente adecuado para la multiplicación y desarrollo.

Basándose en los requerimientos de  $O_2$ , las bacterias pueden dividirse en:

ANAEROBIOS OBLIGADOS (Anoxibióticos)	Crece solo en condiciones de alta densidad reductora. Incapaces de utilizar $O_2$ , el cual les resulta tóxico.
ANAEROBIOS AEROTOLERANTES	No mueren por exposición al $O_2$ .
ANAEROBIOS FACULTATIVOS	Son capaces de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Ej. <i>Enterobacteriaceae</i> .
AEROBIOS OBLIGADOS	Requieren $O_2$ para su crecimiento. Ej. <i>Pseudomonas</i> spp.
MICROAEROFILO	Crece mejor con bajas tensiones de $O_2$ y son inhibidos por altas tensiones de $O_2$ . Ej. <i>Streptococcaceae</i>
CAPNOICO	Requieren una tensión de $CO_2$ aumentada antes que una tensión de $O_2$ disminuida. Ej. <i>Brucella</i> , <i>Campylobacter</i> .
AEROTOLERANTES	Crece mejor en ausencia que en presencia de $O_2$ . Ej. <i>Clostridium histolyticum</i> .

En los anaerobios obligados y en los aerotolerantes, el metabolismo es estrictamente fermentativo. Sin embargo, los anaerobios facultativos emplean un modo respiratorio de metabolismo cuando disponen de  $O_2$ , pero en su ausencia se produce fermentación. El requerimiento de una tensión de  $O_2$  reducida, en los microaerófilos, es indicador de la presencia de enzimas que son inactivadas bajo condiciones fuertemente oxidantes.

El conocimiento de estas bacterias es poco y relativamente reciente ya que para poder lograr condiciones de anaerobiosis en el Laboratorio se necesitaban, hasta los años 60, equipos costosos y técnicas bacteriológicas muy dificultosas. A partir de la introducción de sistemas simples para producir anaerobiosis con equipos y reactivos de bajo costo el conocimiento de los anaerobios se desarrolla intensamente. Aun así, no hay un gran número de Microbiólogos que se dediquen al tema, la taxonomía está en permanente revisión e infinidad de aspectos se mantienen oscuros.

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos básicos usados para gérmenes anaerobios difieren de los usados para aerobios o facultativos, principalmente porque la incubación se hace en ausencia de aire.

Los cultivos incluyen el uso de Jarras anaeróbicas, bolsas plásticas, el método PRAS de Hungate y la Cámara de anaerobiosis o "cámara de guantes". Los dos últimos métodos son muy caros, requieren equipamiento complejo, son lentos y se usan para estudios de Flora Normal y en laboratorios altamente especializados.

Desde el punto de vista práctico las Jarras pequeñas y los sobres o bolsas son equiparables en rendimiento a los más sofisticados y son aceptables para los estudios de anaerobios de interés médico. Con estos sistemas son posibles los cultivos en medios sólidos para la obtención de aislamientos que permitan la identificación bacteriana. El uso de medios líquidos en forma exclusiva no es recomendable (salvo para hemocultivos) ya que la mayoría de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas incluyendo facultativos o microaerófilos.

**Medios líquidos** (solo para hemocultivos). Existen varios medios comercialmente disponibles. Algunos contienen (SPS) sodium polyanetol sulfonate el cual estimula el desarrollo de los anaerobios, aunque al parecer sería inhibidor para *Peptococcus anaerobius*. Se trata de frascos de 100 ml, al vacío, con el agregado de CO<sub>2</sub>, una base nutritiva (digerido trípico de soja o peptonas) y un agente reductor (thiol o thioglicolato). El porcentaje de sangre a inocular es del 5 al 10 % v/v. Los frascos se examinan diariamente buscando turbidez, hemólisis o gas; se consideran negativos definitivamente a los 10 días de incubación previo subcultivo final.

**Jarras de Anaerobiosis.** Existen varias marcas comerciales de jarras con performance aceptable para generar atmósfera de anaerobiosis. El fundamento del sistema más utilizado (Gas Pak)- se basa en:

1. La generación de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por medio de una reacción química cuyos sustratos se encuentran separados en un sobre al cual se le agrega agua, desencadenando la reacción.
2. La combinación del H<sub>2</sub> y el O del aire para formar agua generan la anaerobiosis, esta reacción se cataliza utilizando granallas de Zinc recubiertas de Paladio las cuales se encuentran depositadas en una canastilla dentro de la jarra. Una tirilla de papel impregnada en Azul de metileno (azul en presencia de O<sub>2</sub>, incoloro en ausencia) introducida en la Jarra es el indicador de Anaerobiosis. Se fundamenta más adelante.

**Sobres de Anaerobiosis.** El sistema BioBag consiste en una bolsa plástica transparente, gas impermeable, una ampolla de indicador de anaerobiosis (resarzurina) y una ampolla generadora de anaerobiosis. Una o dos placas de Petri pueden introducirse antes de sellar la bolsa mediante un sellador plástico por calor. Luego se rompen las ampollas de indicador y generador. Los gérmenes crecen y se mantienen viables por lo menos una semana. Este sistema tiene las ventajas de su economía y practicidad.

Los medios comerciales para anaerobios evitan al laboratorio la tarea de preparar medios especiales.

El procedimiento crítico es el aislamiento de colonias; al igual que con otros microorganismos, deben obtenerse colonias aisladas, que deben ser el resultado de la agrupación de células bacterianas individuales, siendo las de algunas especies muy sensibles al O<sub>2</sub>, incluso en pequeños vestigios.

El metabolismo anaerobio es mucho menos eficiente que el aerobio para obtener energía, por tanto, los medios de cultivo tienden a ser mucho más ricos que los de uso común para aerobios y facultativos. Además, se requiere una incubación más prolongada, usándose 2 o más días para el aislamiento general.

No todos los anaerobios poseen relaciones similares con el O<sub>2</sub>, en realidad, forman un espectro continuo, desde los microorganismos que son capaces de crecer, aunque apenas, sobre las superficie de medios sólidos expuestos al aire, hasta los incapaces de crecer si la atmósfera contiene solo 0,03% de O<sub>2</sub>.

La indicación de género y especie se hace como para los facultativos o aerobios, aunque dando mayor importancia a los productos de fermentación (ej.: Ac. Láctico, Ac. Succínico, Ac. Propiónico, etc.).

## 1. EXTRACCIÓN DEL O<sub>2</sub> DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

**A) CALOR:** realizar siempre esta operación con todos los medios de cultivo antes de la siembra para anaerobios.

Como el O<sub>2</sub> es menos soluble en agua caliente que en fría, es suficiente colocar a los tubos conteniendo medio de cultivo en un baño de agua hirviente durante 15 a 20 minutos, y luego introducirlos en agua fría rápidamente sin agitar. De esta manera se elimina el O<sub>2</sub> de los medios de cultivo.

**B) SISTEMA GAS PAK:** explicado en el punto anterior, es el mejor método para el cultivo de bacterias anaerobias. Permite utilizar medios líquidos o solidificables en profundidad o superficie en tubos o en cajas de Petri. A diferencia de otras jarras, no tiene conexiones externas.

Se utiliza un sobre descartable para la generación de Hidrógeno y de Anhídrido carbónico, eliminando de esta manera la necesidad de bombas de vacío, tanques de gases, manómetros, etc. Se emplea un catalizador de Paladio a temperatura ambiente, eliminando el uso de conexiones eléctricas para calentar el catalizador.

El sobre Gas Pak contiene como generador de hidrógeno tabletas de borohidruro de sodio, que, al reaccionar lentamente con el agua, desprende H<sub>2</sub> en cantidad necesaria para producir anaerobiosis.



Como fuente de anhídrido carbónico se utilizan tabletas de ácido cítrico o bicarbonato de Na. El indicador de anaerobiosis es el azul de metileno.

**Técnica:**

1. Colocar los cultivos en la jarra conjuntamente con un sobre de Gas Pak.
2. Cortar la esquina sobre Gas Pak y adicionar 10 ml de agua.
3. Colocar la tapa y agarradera y apretar el tornillo.

El hidrógeno producido reacciona con el oxígeno en presencia del catalizador, produciendo anaerobiosis. También desprende la cantidad suficiente de CO<sub>2</sub>.

Durante la incubación, la reacción entre el O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>, se pone de manifiesto por la condensación de agua que empaña ligeramente la superficie interna de la jarra, y por el calentamiento de la tapa sobre el catalizador.

El indicador a las pocas horas se torna incoloro.

**C) OTROS SISTEMAS:** todos los medios de cultivo para anaerobios deben protegerse de la acción del O<sub>2</sub> del aire. Es necesario, por lo tanto, realizar alguno de estos procedimientos:

-*Cierre de parafina, vaselina o agar.* Tubos conteniendo medio líquido estéril o, después de sembrados, se cubren con una capa de vaselina o parafina estériles (líquidas).

-*Medios solidificables.* En los medios solidificables la difusión del O<sub>2</sub> se efectúa en las capas superiores, en cambio la parte inferior se considera casi anaerobia.

Se aconseja depositar el inóculo en el fondo del tubo con una pipeta pasteur, y luego adicionarle 15 a 20 ml del medio de cultivo agarizado, previamente fundido y enfriado a 50°C.

Todos los procesos de extracción de O<sub>2</sub> tienen como consecuencia una disminución del rH. Los métodos de protección también incluyen esta particularidad. Pueden por tanto, adicionarse al medio de cultivo sustancias reductoras como cisteína, ac. tioglicólico y otros para evitar la formación de óxidos y peróxidos que son tóxicos para las bacterias.

**2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

La toma de muestra idealmente debe realizarse en el laboratorio, evitándose al máximo el contacto con el O<sub>2</sub> de los gérmenes supuestamente presentes en el material, lo que implica el rápido procesamiento del mismo. El tener que transportar la muestra es un factor fundamental que afecta el éxito final de los cultivos para anaerobios.

Las bacterias deben ser protegidas de los efectos letales del O<sub>2</sub>, desde el momento de la obtención de la muestra hasta que es colocada en un medio ideal para anaerobios.

Inmediatamente después de su obtención, los especímenes deben ser colocados en un medio de transporte para anaerobios. Como ejemplos de estos, se citan los siguientes:

**A) TÉCNICA CERRADA:** tubo con doble tapa que contiene N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> libre de O<sub>2</sub>, y un sistema de agar o caldo con indicador. Se inyecta la muestra a través de un tapón de goma, evitando la introducción de aire. Puede así mantenerse hasta el momento de su inoculación.

**B) TÉCNICA EN TUBO ABIERTO:** requiere la introducción de gas libre de O<sub>2</sub> mediante una cánula.

**C) AGUJA Y JERINGA:** una vez tomada la muestra se introduce la punta de la jeringa en un tapón de goma estéril. Este es un método muy económico y muy usado para la clínica.

**D) HISOPADO:** no muy recomendado. Se prepara en un tubo anaeróbico y luego se introducirá (ya con la muestra) en un medio de transporte anaeróbico: Cary Blair (pras), otros. Hay excesiva exposición de los gérmenes al O<sub>2</sub>.

Deben procesarse las muestras dentro de las 2 horas de obtenidas.

### 3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

**A) EXAMEN MACROSCÓPICO:** anotar características macroscópicas y caracteres organolépticos de las muestras examinadas.

**B) EXAMEN MICROSCÓPICO:** preparar un extendido para realizar coloración de Gram y la observación microscópica en objetivo de inmersión (La coloración irregular y pleomorfismo resultan muy comunes).

#### C) SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Todos los materiales destinados al estudio de bacterias anaerobias deben sembrarse también en aerobiosis. Pueden emplearse medios líquidos y sólidos.

**1) Medios Líquidos:** el uso de medios líquidos como única técnica de cultivo para anaerobios no resulta muy satisfactoria, excepto en el caso de los hemocultivos.

Una de las desventajas más importantes es que no es factible la determinación cuantitativa.

Estos solo se utilizan como auxiliares de otros medios, por ejemplo para la reactivación de esporas, el medio caldo de arvejas utilizando vaselina para conservar atmósfera de anaerobiosis.

Ejemplos: Caldo Sangre para anaerobiosis, Caldo ICC, suplementado con extracto de levaduras, caldo thiol, caldo carne suplementado, etc. (Fig. 7.1 a)

**2) Medios Sólidos:** tal como se explicara anteriormente, deben ser más ricos que los medios de uso frecuente para aerobios o facultativos.

- Agar sangre para anaerobios: el agar base puede ser agar Brucella, o Agar ICC complementado con hemina y extracto de levadura. Se agrega sangre animal normal (5%), vitamina K1 (10 mg/l), Extracto de levadura (0,5%) y cisteína (0,05%).

- Placa idéntica, pero adicionando un aminoglucósido para inhibir el desarrollo de facultativos.

- No son convenientes placas de agar T.S.A., I.C.C. sin suplementos.

- Se puede utilizar también agar Mc Conkey, Agar Base Columbia (con colistina, ac. nalidíxico), agar sangre alcohol feniletílico anaerobio, etc. (Fig. 7.1b)

*Importante es recordar que deben ser medios de reciente preparación, hervidos en el momento de usar.*

#### D) IDENTIFICACIÓN

Una vez aislados los gérmenes, debe comprobarse su condición de anaerobio mediante subcultivos en aerobiosis y en atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.

### ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN PARA ANAEROBIOS

Los anaerobios se presentan corrientemente en cultivos mixtos con otras especies sea anaerobias, microaerófilas o facultativas.

El primer paso es, pues, la observación de las colonias y su correspondiente Gram para establecer distintas especies, las cuales serán subcultivadas para establecer aerotolerancia “aire, CO<sub>2</sub> y anaerobiosis”.

Información complementaria puede obtenerse observando las placas de Petri bajo luz UV para determinar la fluorescencia de las colonias. En las placas de Subcultivos (con medios ricos, selectivos y/o diferenciales), según la sospecha de Género, pueden agregarse Discos de Vancomicina 5 µg, Kanamicina 1000 µg, Colistin 10 µg, SPS y NO<sub>3</sub>, los cuales aportan datos para la identificación preliminar. En el diagrama siguiente se esquematizan los pasos a seguir:

**- OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA**

**Cultivo en placa**

<b>Registrar</b>	<b>Realizar:</b>
Morfología de colonias	Gram
Pigmento	Indol
Hemolisis	Catalasa
Flourescencia	Test de NO <sub>3</sub>
Susceptibilidad a: Vancomicina Kanamicina Colistin SPS	
Actividad lipasa	
Actividad lecitinasa	

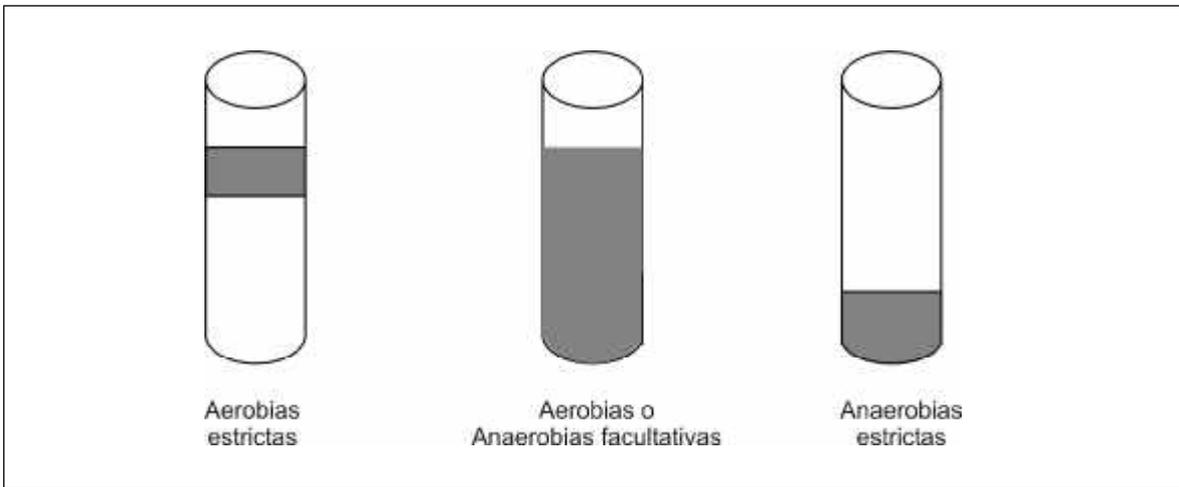
**- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA**

En la reacción de Gram, observar la morfología de las células vegetativas y su disposición en racimos, cadenas, etc., la presencia o ausencia de esporos, movilidad y flagelos son puntos claves en la clasificación e identificación de las bacterias anaerobias.

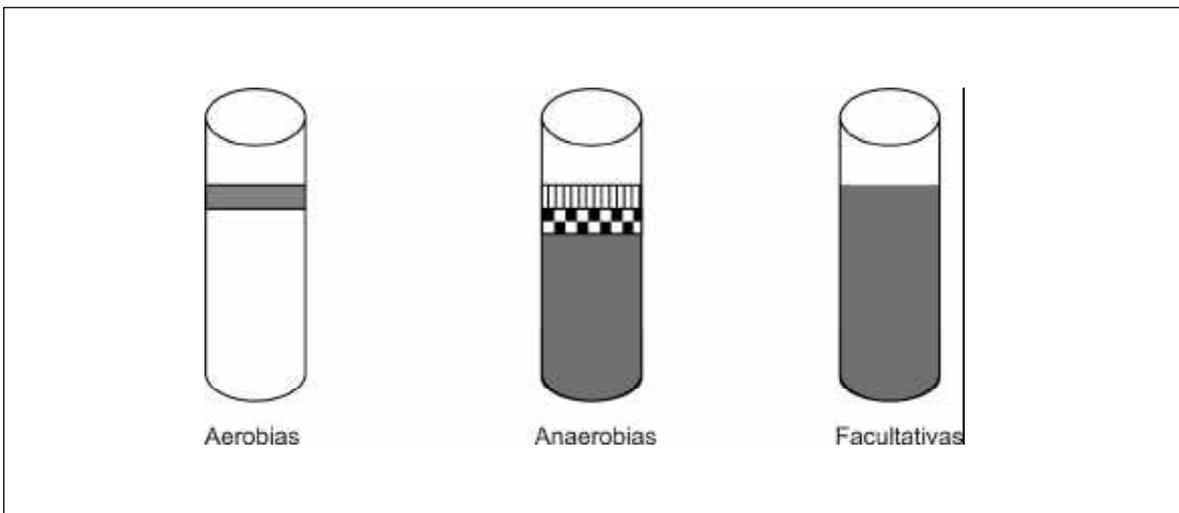
**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.** Útiles para la Diferenciación de las Bacterias Anaerobias.

La mayoría de los Laboratorios deben conformarse con la realización de los Tests de Identificación preliminares. La identificación final queda reservada para los laboratorios de Referencia y comprende:

- Estudios de fermentación de azúcares y estudio de los productos finales del metabolismo, los cuales pueden agruparse en: Ácidos grasos volátiles y alcoholes. Metabolitos no volátiles. Ácido fórmico. Producción de Hidrógeno. Estos estudios se realizan utilizando la Cromatografía Gas-líquida.
- Reacciones en agar yema de huevo (lecitinasa, lipasa, proteólisis).
- Producción de Indol, H<sub>2</sub>S, ureasa.
- Hidrólisis de esculina y almidón.
- Fermentación de Hidratos de Carbono (glucosa, manitol, lactosa).
- Reducción de Nitrato.
- Acción sobre la leche, gelatina.
- Crecimiento en presencia de 20% de bilis.
- Catalasa.



**Figura 7.1:** Relación de las bacterias con el oxígeno.



**Figura 7.2:** Crecimiento de bacterias aerobias, anaerobias y facultativas en cultivos "agitados" de agar. Los tubos con agar nutritivo derretido y enfriado se inoculan y mezclan, y se dejan endurecer. Aparece el crecimiento de colonias en la forma indicada, según los requerimientos de oxígeno del microorganismo.



## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 7

### SIEMBRA DE MATERIALES PARA BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS MICROAERÓFILOS Y CAPNOICOS.

Cada grupo de trabajo deberá:

- Trabajar con muestras cedidas por los docentes.
- Efectuar siembra para aislamiento de los materiales en medios agarizados: Agar Sangre 5%, Agar Chocolate.
- Incubar 24 – 48 hs en lata con la vela acondicionada según las instrucciones del docente.
- Discutir la fundamentación del proceso de incubación y los resultados esperados.
- Analizar los desarrollos luego de la incubación.
- Efectuar tipificación bioquímica e informar.

#### REACTIVACIÓN DE ESPOROS:

##### Preparación del mosto para la reactivación de esporos de *Clostridium acetobutlicum*.

###### Caldo de arvejas

Pesar 0,4 g de harina de arvejas e incorporarla en tubos de ensayo (0,4g de harina por tubo), a lo que se agrega 10 cc de agua destilada.

Colocar los tubos en un baño de agua fría e ir calentando hasta ebullición, agitando frecuentemente los tubos para evitar la formación de grumos.

Una vez gelificados, acondicionarlos y esterilizarlos por vapor fluente durante 20 minutos.

Pueden así guardarse en heladera hasta ser usados.

##### Siembra de los esporos:

Los esporos de *C. acetobutlicum* se conservan en tierra, como se explica más adelante, en ampollas.

Colocar los tubos preparados con harina de arvejas en baño maría hirviente. Cuando han alcanzado la temperatura del mismo (aproximadamente 10 minutos), se retiran del baño y, en condiciones de asepsia, incorporar una porción de tierra con esporos del microorganismo y unos 0,3 ml de vaselina o parafina líquida estériles.

Volver al baño maría inmediatamente y mantenerlos allí durante 2 minutos (choque térmico). Al cabo de este tiempo, retirar los tubos del baño y colocarlos debajo del agua de canilla unos instantes.

Incubar en estufa a 37°C durante 24 y 48 horas.

Transcurrido de ese tiempo se manifiesta el desarrollo por la producción de gas y formación de sombrero. (Se levanta el medio con la vaselina).

Se complementa el estudio con la coloración de Gram.

USOS: En el estudio de Fermentación acetobutílica.

##### Conservación de las cepas:

Se inoculan tubos conteniendo tierra estéril (tubos adelgazados en el medio), mediante el agregado del caldo que ha sido incubado durante 72 horas o más (hasta la comprobación de esporulación con el microscopio).

##### Proceso de Activación de esporos:

###### Preparación del mosto:

Se distribuyen en tubos de ensayo porciones de 0,4 g de harina de arvejas, agregando luego 10cc de agua por tubo. Tapar con algodón y llevar a baño maría (a temperatura ambiente) e ir calentando hasta que se gelifique (unos 20 minutos). Agitar frecuentemente para evitar la formación de grumos.

Esterilizar por Vapor Fluente durante 30 minutos.

Los tubos así esterilizados pueden conservarse durante varios días en la heladera.

**Inóculo de esporos de *Clostridium acetobutílico* conservados en ampollas con tierra estéril.**

Calentar los tubos con el caldo de arvejas en baño María hirviendo unos 3 minutos.

Inocular con una porción de tierra con esporos.

Agregar por las paredes del tubo vaselina estéril o una mezcla de vaselina - parafina a 45°C (aproximadamente 0.3 ml).

**Choque térmico:**

Los tubos inoculados deben ser sometidos a baño maría hirviendo 2 minutos, y luego llevados al agua corriente de canilla rápidamente unos instantes sin agitar para no redissolver el O<sub>2</sub> eliminado.

**Incubación:**

Incubar en estufa a 37°C durante 24 a 48 horas.

La actividad de las bacterias se manifiesta por la formación de gas (SOMBRERO: elevación de la harina gelificada del medio. Separación en dos fases).

El estudio se puede continuar luego con coloración de Gram, siembra en agar malta incubado en atmósfera para anaerobios, obtención de colonias aisladas, pruebas Bioquímicas, etc. No obstante, el proceso de reactivación de esporos tiene utilidad en estudios de fermentación acetobutílica.

## ANEXO AL PRÁCTICO 7 - CONCEPTOS

### POTENCIALES REDOX

El potencial de Óxido Reducción (Eh) de una pareja REDOX es la medida en VOLTIOS de la tendencia espontánea a donar o recibir electrones por parte de uno de los integrantes de la pareja (flujo de electrones). Una pareja REDOX posee una forma reducida (dador de electrones) y una forma oxidante (receptor de electrones).

Reductor  $\longleftrightarrow$  oxidante + electrones.

En consecuencia, cuanto menor sea la cantidad de formas oxidantes, menor o más bajo será el potencial REDOX. La presencia de O<sub>2</sub> en los cultivos o en el medio natural debe ser eliminada imprescindiblemente del microclima de desarrollo (O<sub>2</sub> atmosférico y en solución). Aún más, el descenso de los Eh debe afirmarse con la presencia en el medio de sustancias reductoras que superen en gran número a las oxidantes.

### FLORA NORMAL ANAEROBIA

El hombre (conjuntamente con los animales mamíferos, aves, peces) es hospedero en sus epitelios, mucosas y aparatos, de un gran número de Especies y de un gran número de individuos anaeróbicos. Estos son miembros de una FLORA NORMAL beneficiosa y hasta, en algunos casos, esencial para la vida. El conocimiento de esta flora normal es importante desde varios ángulos. Si pensamos que muchas infecciones anaeróbicas se desarrollan en la vecindad de las superficies mucosas en las cuales estos gérmenes predominan como flora autóctona, el conocimiento de la misma se presenta de gran utilidad para sospechar quiénes estarían involucrados en los procesos infecciosos. Esta información ayuda al Clínico para establecer una antibioticoterapia empírica racional y al microbiólogo para seleccionar los Medios de Cultivo más apropiados al aislamiento e identificación bacterianos.

	Piel	V.R.S.(#)	Boca	Intestino	Genitales externos	Uretra	Vagina
Bacilos Gram (+) esporulados <i>Clostridia</i>	0	0	1	3-4	0	1	1
Bacilos Gram (+) no esporulados	0	2	2	1	0	0	0
<i>Actinomyces</i>	0	0	2	1	0	0	2
<i>Bifidobact.</i>	1	1	2	3-4	d	d	1
<i>Eubacterium</i>	0	0	2	2	0	1	3-4
<i>Lactobac. (*)</i>	3-4	2	1	1	d	0	2
<i>Propionibact.</i>							
Bacilos Gram (-) no esporulados	0	2	3-4	2	2	2	2
<i>Bacteroides</i>	0	2	3-4	2	2	2	1
<i>Fusobacterium</i>							
Cocos G (+)	2	2	3-4	3-4	2	1	2
Cocos G (-)	0	2	3-4	2	0	d	2

**Tabla 7.1** muestra el predominio de las especies más comunes como flora normal humana según diferentes localizaciones.

(#) Vías Respiratorias Superiores: incluye vías nasales. Orofaringe y amígdalas.

(\*) Incluye anaerobios, facultivos y microaerófilos.

(d = desconocido) (0 = no encontrados o raros) (1 = hallazgo irregular) (2 = habitualmente presentes) (3-4 presentes)

Fuente: Anaerobios, En: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2026.pdf>



## TRABAJO PRÁCTICO 8

### ANTIMICROBIANOS

#### OBJETIVOS

- Realizar un ensayo de sensibilidad a antibióticos de un aislamiento bacteriano utilizando el método de Kirby Bauer.
- Leer los diámetros de halos e Interpretarlos para cada caso como sensibles, intermedios o resistentes, y hacer el informe correspondiente.
- Conocer otras metodologías de evaluación de sensibilidad en bacterias.

### INTRODUCCIÓN

El uso y abuso de los antibióticos en las terapias contra infecciones de origen bacteriano conlleva a la selección de cepas bacterianas resistentes. La diseminación de estas resistencias a otras cepas de la misma o diferente especie se ve facilitada cuando los marcadores de resistencia (genes) se encuentran en elementos genéticos móviles como son Plásmidos y/o transposones.

Tal como se verá más adelante, la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos se determina mediante técnicas basadas en la dilución o difusión del antibiótico en un medio de cultivo donde desarrolla el microorganismo en estudio.

### ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos forman un grupo heterogéneo de sustancias que interfieren en determinadas reacciones metabólicas de los microorganismos, ocasionando detención de la multiplicación o muerte de los mismos.

En realidad, solo los antibióticos del grupo de las penicilinas actúan exclusivamente contra las bacterias (pues estos agentes bactericidas inhiben la síntesis de la pared celular), mientras que los demás antimicrobianos interfieren sobre los procesos metabólicos tanto del huésped como de las bacterias. La razón por la cual las bacterias son las preferentemente afectadas, reside en el hecho de que los procesos metabólicos microbianos son más rápidos que los observados en las células del huésped.

Para ejercer su acción, los antibióticos deben llegar en concentración suficiente al sitio de la infección (un antibiótico es efectivo en muy bajas concentraciones 1/10 ppm por ejemplo), para ello el fármaco debe atravesar varias barreras de permeabilidad variable, a través de difusión simple dependiente de un gradiente de concentración o por medio de transporte contra gradiente de concentración.

A nivel celular, la acción de los antibióticos sobre las bacterias se ejerce por uno de los mecanismos siguientes:

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular, ej.: penicilinas, cefalosporinas, cicloserina.
- 2) Alteración de la permeabilidad de la membrana celular, ej.: polimixinas, imidazoles.
- 3) Inhibición de la síntesis de DNA, ej.: quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina).
- 4) Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (ribosomas), ej.: aminoglucósidos, cloranfenicol, Tetraciclinas.
- 5) Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana, ej.: sulfonamidas, trimetoprim, isoniazidas.

La acción antibacteriana de los antibióticos que actúan sobre la pared celular se ejerce durante el proceso de crecimiento y replicación bacteriana, (ej.: cicloserina: bloquea la incorporación de d-alanina en el pentapéptido de la pared; penicilina, en etapa final de la formación de la pared) ello determina pérdida de la capacidad bacteriana para conservar su estructura, es decir, lisis dada la hiposmolaridad circundante.

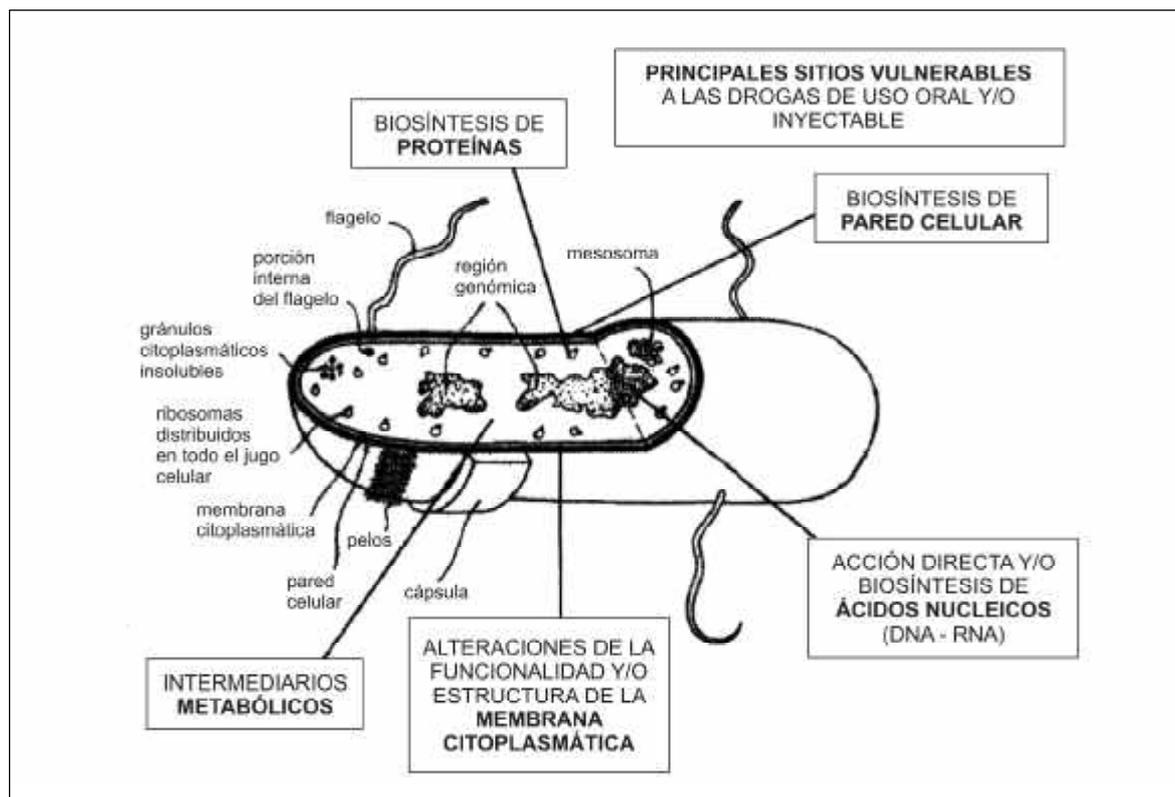


Figura 8.1. Principales sitios de acción de los antimicrobianos. (Tomado de Basualdo, Coto y Torrez).

Los antibióticos que alteran la función y permeabilidad de la membrana modifican la estructura lipoproteica de la misma, lo que determina pérdida de la barrera osmótica celular y anula funciones metabólicas oxidativas de la bacteria, situadas en cercanías de dicha membrana. (Ej. Polimixina: como detergente se une a radicales fosfato de la membrana).

Antibióticos como el ácido Nalidíxico bloquean la síntesis del ADN por su semejanza con las purinas.

Los antibióticos que alteran la síntesis proteica, determinando la formación de proteínas defectuosas, son bactericidas (Aminoglucósidos), mientras que los que inhiben ciertos pasos metabólicos en la formación de proteínas son bacteriostáticos (Cloranfenicol).

El lugar de acción de cada uno de estos antibióticos es variable.

Finalmente, los antibióticos que inhiben la síntesis de metabolitos esenciales tienen, en general, una estructura semejante a ciertas moléculas esenciales para el metabolismo microbiano y, a excepción de la Isoniacida, son bacteriostáticos.

Tanto las Sulfonamidas, las Sulfonas como el ácido Paraaminosalicílico, son parecidas en su estructura al ácido Paraaminobenzoico, componente esencial en la síntesis del ácido Fólico.

La Trimetoprima, en cambio, actúa bloqueando la síntesis del ácido Fólico por inhibición de la enzima reductora del mismo.

La Isoniazida, al parecer, actúa incorporándose a la molécula de NAD, bloqueando el transporte de hidrógeno en la célula bacteriana.

## DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD EN EL LABORATORIO

Los principales métodos utilizados para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico comprenden:

- -LAS PRUEBAS DE DILUCIÓN: en tubos con caldo o en placas de agar.
- -LAS PRUEBAS DE DIFUSIÓN en placas de agar: usando discos de papel impregnados con el antibiótico.

Cada método tiene sus ventajas y sus limitaciones. En cuanto a las pruebas de sensibilidad por dilución en caldo, que fue una de las primeras en llevarse a cabo, aun hoy sigue usándose como método de referencia, porque permite la determinación bastante exacta de la sensibilidad al antibiótico (en volumen medido en unidades o en microgramos), pero lleva tiempo y es costoso, por lo que su uso queda limitado a casos especiales.

## EL ANTIBIOGRAMA

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no solo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene, a la larga, consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable hacer de los antibióticos un uso racional para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos.

El conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos, del microorganismo causante de una enfermedad no es solo importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que además, en aquellos casos en los cuales el paciente presente intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para ese paciente en particular.

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitorio sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos o quimioterápicos ensayados.

Usualmente se utiliza el agar de Mueller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. Cuando se trata de estreptococos u otros microorganismos exigentes, se le añade al Mueller-Hinton, 5% de sangre desfibrinada, generalmente ovina.

De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada de este método es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición.

## FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER

En el método de Kirby Bauer el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre la cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards, actualmente CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute).

Dado que las pruebas de sensibilidad *in vitro* dan solamente una idea aproximada de la acción inhibitoria contra los microorganismos, es necesario tener presente que la verdadera respuesta de estos ante los antibióticos, es la respuesta clínica del paciente luego de administrada la dosis adecuada del mismo.

Las pruebas de sensibilidad se indican para cualquier microorganismo causante de un proceso infeccioso que necesite tratamiento antimicrobiano, y cuya sensibilidad no puede ser predecida.

Existen microorganismos que muestran sensibilidad variable a los antibióticos de uso común: Estafilococos, Enterobacterias, Pseudomonas, Enterococos y algunos bacilos Gram (-) no fermentadores de glucosa.

Debe realizarse el antibiograma con **cepa pura**, utilizando varias colonias de aspecto semejante del germen a probar.

## METODOLOGÍA

### -PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CON EL MEDIO DE CULTIVO:

Debe utilizarse Agar de Mueller Hinton, no otro. El pH es de 7,2 a 7,4.

Este agar es el más indicado porque:

- Presenta buena reproducibilidad de resultados lote a lote.
- Es pobre en contenido de timina (compiten con las sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas, lo que daría falsas resistencias).
- Brinda buen crecimiento a muchos patógenos.
- Se encuentra gran cantidad de datos sobre pruebas de sensibilidad con este medio.

Deben verse por placa de 25 a 30 ml de agar fundido para obtener una altura de 4 mm. Esto es importante para no obtener halos excesivamente reducidos o ampliados. Preparadas y envueltas, pueden conservarse de 4 a 7 días en la heladera.

Para evitar las gotas de condensación en la superficie del agar, secar las placas de 15 a 30 minutos invertidas en estufa a 37°C antes de la siembra.

### -PREPARACIÓN DEL INÓCULO:

Se toman 3 a 10 colonias bien aisladas con un ansa y se introducen en 5 ml de caldo de tripteínas soya. Se pretende obtener la turbidez del testigo (0,5 de la escala Mc Farland: 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,048 M (1,175 % P/V) + SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> O, 36 N (1% V/V). En base a esta comparación se determina si es necesario incubar a 37°C, diluir en Sn Fisiológica o directamente sembrar en agar Mueller Hinton.

### -SIEMBRA DE LAS PLACAS:

Se sumerge un hisopo estéril de algodón en el inóculo, oprimiendo el algodón contra las paredes del tubo para descartar el exceso de líquido. Se aplica el hisopo sobre la superficie del agar estriando uniformemente y rotando la placa cada 60°. Se seca unos 5 minutos antes de aplicar los discos.

### -COLOCACIÓN DE LOS DISCOS:

Se realiza con una pinza estéril, cuidando que hagan buen contacto con la superficie del agar (haciendo una ligera presión).

En las placas de 100 mm se recomienda utilizar solamente 7 discos, pues si se excede su número, y hay superposición de halos, se dificulta la lectura y pueden darse fenómenos de sinergismo y antagonismo.

Luego de 15 minutos de colocados los discos, se incuba en estufa a 37°C durante 16 a 18 horas.

### -SELECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS:

Existen listas de antimicrobianos sugeridas para pruebas de rutina que se basan en factores microbiológicos, clínicos y farmacológicos.

En general se prueba un representante de cada familia de drogas relacionadas y con semejante espectro de sensibilidad.

Ciertas drogas se usan solo para infecciones urinarias, por lo tanto no deben probarse ni informarse en gérmenes aislados de otros materiales. Por ejemplo: Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoína, Ac. Pipemídico.

### -MEDICIÓN DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN:

Con una regla o calibre se mide el diámetro de los halos incluyendo el disco de 6 mm de diámetro.

Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con el desarrollo invasor (*Proteus mirabilis* o *Proteus vulgaris*), se debe ignorar el ligero velo y medir el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente. Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no.

Cuando aparecen colonias aisladas dentro del halo de varios antibióticos con distinto mecanismo de acción, por ejemplo cloranfenicol, fosfomicina, y gentamicina, corresponde a cultivos impuros, por fallas en el aislamiento. Se deben realizar, en tal caso, antibiogramas por separado de cada especie.

Cuando las colonias aparecen en un solo antibiótico o en antibióticos muy relacionados (penicilina y ampicilina), suele obedecer a bacterias previamente resistentes en la población usada como inóculo. Es prudente informar como resistente y sugerir una CIM o CBM en caso de que se desee administrar el ANTIBIÓTICO en cuestión.

**-INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:**

Para cada antibiótico ensayado puede concluirse que el germen es sensible, moderadamente sensible, de sensibilidad intermedia o resistente, cotejando nuestra lectura con la de tablas.

Aunque siempre deben informarse solo como Resistentes o Sensibles, se debe indicar al médico la existencia de antibióticos de sensibilidad intermedia o moderadamente sensibles cuando el germen presenta resistencia a todos los demás antibióticos ensayados o cuando el criterio clínico lo exija y aconseje su uso.

Con respecto a la categoría *intermedia*, debido a la discrepancia que puede haber por factores técnicos no controlados, los resultados con estas drogas deberían informarse con pruebas de dilución.

La categoría moderadamente sensible, indicaría sensibilidad bajo ciertas condiciones. Por ej. Beta lactámicos usados en ciertas dosis o en sitios del cuerpo humano donde se concentran las drogas fisiológicamente.

VER ANEXO 2 - TP 8: "PUNTOS DE CORTE PARA LA INTERPRETACIÓN DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER (K-B)".

**-CONTROL DE CALIDAD:**

Conviene realizar quincenalmente controles con cepas para las cuales los halos de inhibición son conocidos. Así se evalúa la calidad de los discos, medios y metodología usada.

Estas cepas son *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

El contenido de timina del medio de M. H. debe controlarse con discos de trimetoprima-sulfametoxazol frente a *S. faecalis* ATCC 29212.

VER ANEXO 3 - TP 8: "TABLA DE VALORES DE CORTE PARA REALIZAR EL CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO DE K-B".

**OTRAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD**

Debemos recordar que la técnica de Kirby Bauer es usada para microorganismos que desarrollan rápidamente y que no son nutricionalmente exigentes. Para gérmenes nutricionalmente exigentes, aerobios y anaerobios de desarrollo lento, microaerófilos, etc., existen técnicas y metodologías especiales, por ejemplo:

Para *Haemophilus influenzae*, debe usarse agar de M.H. suplementado con 1% de hemoglobina o 5% de sangre equina y 1% de Isovitalax, suplemento VX o suplemento sintético equivalente. Ajustar a pH 7,2.

Para Micobacterias, el agar de elección es Lowestein Jensen o agar 7H11, aunque existen otros. Recordemos que el tiempo de incubación es prolongado.

Para anaerobios se realizan antibiogramas por métodos de elución de antibióticos en caldo. También suelen realizarse en placas empleando otras técnicas.



## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 8

Se prepararán las placas según las instrucciones del docente, y a partir de una cepa aislada se realizará un antibiograma en medio sólido, que se leerá transcurrido el tiempo correspondiente.

### MATERIALES:

Ansa ojal  
Pinzas metálicas  
Reglilla  
Hisopos estériles  
Placas estériles  
Pipetas  
Tubos estériles  
Medio de cultivo agar Mueller Hinton  
Solución fisiológica estéril  
Discos con antimicrobianos  
Microorganismos de ensayo  
Patrón de turbidez (sn BaCl<sub>2</sub>)  
Cepas control (*E. coli*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*)  
Vaso de precipitado con alcohol

### MÉTODO:

- a) Fundir el medio, enfriar a 50°C y distribuir en placas de Petri hasta una altura de 4 mm (25 a 30 ml para placas de 9cm).
- b) Dejar solidificar y secar en la estufa a 35°C (si hay exceso de humedad en la superficie del agar), colocando las placas abiertas invertidas de 10 a 30 minutos.
- c) Preparar una suspensión del microorganismo en estudio, en caldo o Sn Fisiológica estéril con una turbidez comparable al standard.
- d) Dentro de los 15 minutos de ajustada la turbidez, sumergir el hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo contra la pared del tubo para remover el exceso de inóculo.
- e) Sembrar en superficie diseminando el inóculo (con el hisopo) sobre el agar M.H. Repetir este procedimiento rotando 60° la placa cada vez, para asegurar una distribución uniforme.
- f) Esperar 10 a 15 min. y colocar los discos.
- g) Incubar a 35°C durante 16 a 18 horas.
- h) Realizar también este procedimiento con una cepa patrón para controlar los discos.

### RESULTADOS:

Verificar la Sensibilidad de los microorganismos frente a los distintos antibióticos, midiendo con una reglilla el diámetro de la zona de inhibición completa incluyendo el diámetro del disco y comparando con la tabla estándar (ANEXO 2 - TP 8). De acuerdo a los resultados obtenidos se realizará el informe SEGÚN EL SIGUIENTE MODELO:



## ANEXO 1 – TP 8: DEFINICIONES OPERATIVAS

**AGENTE ANTIMICROBIANO:** cualquier sustancia química que mata o inhibe la proliferación de los microorganismos.

**QUIMIOTERÁPICOS: QUIMIOTERAPIA.** Rama de la farmacología que se ocupa del estudio de sustancias de composición química definida que, introducidas en el organismo, son capaces de lesionar o destruir específicamente los agentes patógenos vivos, sin presentar efectos tóxicos **acentuados** sobre el huésped.

Todas las sustancias que responden a esta definición serán consideradas quimioterápicos.

Según su origen, se clasifican en:

- **QUIMIOTERÁPICOS DE SÍNTESIS.**
- **QUIMIOTERÁPICOS DE ORIGEN NATURAL** (producidos por microorganismos).

**BACTERICIDAS:** sustancias que matan bacterias y pueden o no matar otros microorganismos.

Los agentes “cidas” con amplio espectro, se llaman **GERMICIDAS**. Se dividen en dos grupos: **ANTISÉPTICOS** y **DESINFECTANTES**.

Las sustancias que no matan, sino solo inhiben la proliferación, se denominan **BACTERIOSTÁTICOS**, no obstante algunos bactericidas en bajas concentraciones pueden ser bacteriostáticos.

**ANTISÉPTICOS:** son aquellas sustancias que se oponen al desarrollo de gérmenes sobre la piel o mucosas, heridas, etc., ya que son inofensivos para estos tejidos, no así para ingerirlos.

**DESINFECTANTES:** son aquellas sustancias químicas capaces de destruir en 10 a 15 minutos a gérmenes depositados sobre materiales de distinta naturaleza (no así a sus esporas necesariamente), alterando lo menos posible el sustrato donde reside y abarcando en esa destrucción todas las formas vegetativas, hongos y algunos virus. Son potentes microbicidas, pero hasta cierto punto tóxicos e irritantes para los tejidos vivos, por lo que se aplican preferentemente en superficies ambientales u objetos contaminados.

**ANTIBIÓTICOS:** se incluyen aquí aquellos compuestos que conservando la estructura base del antibiótico inicial (natural), son obtenidos por vía sintética o semisintética.

Tres grupos de microorganismos son los responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos usados en medicina:

- 1) **Hongos** (especialmente *Penicillium*) que producen antibióticos como la penicilina y la griseofulvina.
- 2) **Bacterias** del género *Bacillus*, de las que se obtienen antibióticos como la bacitracina y la polimixina.
- 3) **Actinomycetos** (del género *Streptomyces*), que fabrican antibióticos como la estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina.

### DETERMINACIÓN DE LA CIM POR DILUCIÓN EN CALDO:

1. Se realizan diluciones al medio decrecientes del o los antibióticos, en tubos conteniendo 1 ml de caldo Mueller-Hinton.

2. Se siembra 1ml de una suspensión bacteriana de aproximadamente  $10^5$  bacterias por ml que equivale a una dilución 1/500 del tubo 1 de la escala de Mc Farland.

3. Se realiza un control de crecimiento inoculando un caldo sin antibiótico y un control negativo con caldo sin inocular.
4. Se incuban todos los tubos a 37°C durante 24 horas. Luego se observa turbidez indicativa del desarrollo bacteriano.
5. Se determina la CIM como aquella concentración del antibiótico contenida en el tubo que posee la mayor dilución del mismo, en la que se detecta falta de turbidez. La mínima concentración que inhibe el crecimiento bacteriano.

#### **DETERMINACIÓN DE LA CIM POR DILUCIÓN EN AGAR:**

En el método de dilución en agar, el agente antimicrobiano es incorporado en el medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano.

Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa.

El agar Mueller-Hinton es preparado de una base deshidratada. El pH del agar debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. No deben añadirse cationes suplementarios.

Puede ser suplementado con 5% de sangre de cordero desfibrinada o sangre de caballo lisada en el caso de *Streptococcus pneumoniae*.

Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de los organismos no fastidiosos.

Sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento.

Generalmente las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepas.

**ANEXO 2:  
PUNTOS DE CORTE PARA LA INTERPRETACIÓN DEL MÉTODO DE KIRBY  
BAUER**

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
<b>BETALACTÁMICOS. PENICILINAS</b>				
Ampicilina Enterobacteriaceae	10 µg	13	14-16	17
Estafilococos	10 µg	28	---	29
Enterococos	10 µg	16	---	17
Estreptococos β-hemolíticos	10 µg	18	19 - 25	26
Oxacilina Estafilococo	1 µg	10	11-12	13
Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina	1 µg	---	---	20
Penicilina G Estafilococos	10 U	28	---	29
Enterococos	10 U	14	---	15
Estreptococos β-hemolíticos	10 U	19	20-27	28
Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 µg	17	---	18
Enterobacteriaceae	100 µg	17	18-20	21
<b>COMBINACIÓN CON INHIBIDORES β -LACTAMASA</b>				
Amoxicilina/Ácido clavulánico Estafilococo	20/10 µg	19	---	20
Enterobacteriaceae	20/10 µg	13	14-17	18
Ampicilina/Sulbactama	10/10 µg	11	12-14	15
Piperacilina/Tazobactama Enterobacterias	100/10 µg	17	18-20	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100/10 µg	17	---	18
Estafilococos Meticilina S	100/10	17	---	18
<b>CEFALOSPORINAS</b>				
Cefaclor	30 µg	14	15-17	18
Cefazolina	30 µg	14	15-17	18
Cefepime	30 µg	14	15-17	18
Cefixima	5 µg	15	16-18	19
Cefoperazona	75 µg	15	16-20	21
Cefotaxima	30 µg	14	15-22	23
Cefoxitina	30 µg	14	15-17	18
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18
Ceftiozima	30 µg	14	15-19	20
Ceftriaxona	30 µg	13	14-20	21
Cefuroxima sodica parenteral	30 µg	14	15-17	18
Cefalotina	30 µg	14	15-17	18
<b>CARBAPENEMS</b>				
Imipenem	10 µg	13	14-15	16
Meropenem	10 µg	13	14-15	16
<b>MONOBACTAMAS</b>				
Aztreonam	30 µg	15	16-21	22
<b>GLICOPEPTIDOS</b>				
Teicoplanina	30 µg	10	11-13	14
Vancomicina Enterococos	30 µg	14	15-16	17
Estafilococos	30 µg	---	---	15
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>				
Amicacina	30 µg	14	15-16	17
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Kanamicina	30 µg	13	14-17	18
Netilmicina	30 µg	12	13-14	15
<b>MACROLIDOS</b>				
Azitromicina	15 µg	13	14-17	18
Claritromicina	15 µg	13	14-17	18
Eritromicina	15 µg	13	14-22	23
<b>TETRACICLINAS</b>				
Minociclina	30 µg	15	16-20	21
Tetraciclina	30 µg	15	16-18	19

QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Levofloxacina	5 µg	15	16-18	19
Nalidixico Acido	30 µg	13	14-18	19
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Trovafloracina	10 µg	13	14-1	17
OTROS ANTIMICROBIANOS				
Cloranfenicol	30 µg	12	1-17	18
Clindamicina	2 µg	14	15-20	21
Nitrofurantoina	300 µg	14	15-16	17
Rifampicina	5 µg	16	17-19	20
Sulfonamidas	300 µg	12	13-16	17
Trimetoprima-Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	10	11-15	16

### ANEXO 3: CONTROLES DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN DEL DISCO	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (en mm)	
		CON <i>S. aureus</i> ATCC 25923	CON <i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	10 µg	24-35	15-20
Bacitracina	10 U	17-22	---
Cefalotina	30 µg	25-37	18-23
Cloramfenicol	30 µg	19-26	21-27
Colistina	10 µg	-	11-15
Eritromicina	15 µg	22-30	8-14
Gentamicina	10 µg	19-27	19-26
Kanamicina	30 µg	19-26	17-25
Metilina	5 µg	17-22	-
Neomicina	30 µg	18-26	17-23
Novobiocina	30 µg	22-31	-
Oleandomicina	15 µg	19-28	-
Penicilina G	10 U	26-37	-
Polimixina B	300 U	7-13	12-16
Estreptomicina	10 µg	14-22	12-20
Tetraciclina	30 µg	19-28	18-25
Vancomicina	30 µg	15-19	-

## TRABAJO PRÁCTICO 9

### CONTROL HIGIÉNICO DE MEDICAMENTOS

#### OBJETIVOS

- Reconocer la importancia del control higiénico de medicamentos.
- Interpretar los criterios microbiológicos utilizados.
- Verificar si el medicamento analizado se ajusta a la normativa vigente.
- Realizar control de esterilidad del medicamento, control general, inactivación del conservante, pruebas definitivas.
- Poner en práctica diferentes técnicas microbiológicas: vertido en placa, inoculación de microorganismos de prueba, etc.

### INTRODUCCIÓN

La realización de este ensayo es necesaria para evitar las consecuencias nocivas causadas por microorganismos en el empleo de los medicamentos.

La prueba se basa en la estimación del número de microorganismos aerobios, anaerobios, hongos y levaduras, e identificación de microorganismos patógenos presentes en productos farmacéuticos que han sido elaborados asépticamente.

El control higiénico de medicamentos terminados, elaborados en condiciones asépticas, verifica si los mismos se ajustan microbiológicamente a las normas vigentes.

*Límites microbiológicos para productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles de acuerdo con la vía de administración.  
Disposición 7352/99 Salud Pública*

### CATEGORÍA 1

**Categoría 1.1.** Productos para ser aplicados sobre escaras, ulceraciones o quemaduras graves. Ausencia de gérmenes revivificables.

**Categoría 1.2.** Productos para ser administrados por vía inhalatoria. Recuento de aerobios viables totales: no más de 10 por gramo o mililitro. Ausencia de Enterobacteriaceae en un gramo o mililitro. Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en un gramo o mililitro. Ausencia de *Staphylococcus aureus* en un gramo o mililitro.

### CATEGORÍA 2

Productos para ser administrados por vía nasal, ótica, rectal, tópica y vaginal. Recuento de aerobios viables totales: no más de 10<sup>2</sup> por gramo o mililitro. Ausencia de Entobacteriaceae en un gramo o mililitro. Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en un gramo o mililitro. Ausencia de *Staphylococcus aureus* en un gramo o mililitro.

### CATEGORÍA 3

Productos para ser administrados por vía oral. Recuento de aerobios viables totales: no más de 10<sup>3</sup> por gramo o mililitro. Recuento de hongos y levaduras: no más de 10<sup>2</sup> por gramo o mililitro.

- Recuento de Entobacteriaceae: no más de  $10^2$  en un gramo o mililitro.
- Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* (solamente en forma farmacéutica oral líquida) en un mililitro.
- Ausencia de *Staphylococcus aureus* en un gramo o mililitro.
- Ausencia de *Escherichia coli* en un gramo o mililitro.
- Ausencia de Salmonella en un gramo o mililitro.
- Productos farmacéuticos cuyas materias primas se consideren fuentes de contaminación.
- Ausencia de anaerobios sulfitorreductores en un gramo o mililitro.

## CONDICIONES A TENER EN CUENTA

Los ensayos deberán realizarse por duplicado y bajo condiciones asépticas máximas, para evitar la contaminación con gérmenes extraños no pertenecientes al material en ensayo.

Para la apertura del recipiente se tendrá en cuenta la forma de presentación del medicamento a ensayar.

### APERTURA DE LOS RECIPIENTES

Limpiar bien las superficies exteriores de las ampollas y tapas de los viales y frascos con un agente descontaminante adecuado. Acceder al contenido de manera aséptica.

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE ENSAYO

Consiste en preparar el material de prueba según el tratamiento apropiado a sus características físicas de tal forma que no se altere el número y género de microorganismos, presentes para la realización de procedimientos posteriores.

### SÓLIDOS

Los sólidos que no se disuelven completamente, reducirlos a polvo fino en mortero estéril.

### LÍQUIDOS Y DISPERSIONES

Los líquidos y dispersiones se toman directamente con una pipeta estéril o con aguja y jeringa estéril y se transfiere asépticamente el volumen especificado del material desde su envase hasta un recipiente con el medio de cultivo adecuado, se mezcla sin airear excesivamente.

### UNGÜENTOS, CREMAS Y CERAS

Se transfieren los miligramos correspondientes a cada muestra asépticamente al recipiente conteniendo el medio de cultivo, mezclar, si es necesario calentar a baño María a no más de 35 - 40°C.

### ACEITES

Se transfiere asépticamente el volumen indicado de cada muestra a un recipiente estéril. Se realiza una suspensión con la ayuda de una mínima cantidad de un agente emulsionante estéril (polisorbato, tween). Se agita la mezcla en el momento de la siembra y después durante el periodo de incubación a intervalos frecuentes.

## CONTROL DE ESTERILIDAD DEL MEDICAMENTO

Los controles de esterilidad tienden a regular la asepsia y esterilidad de las áreas de manufactura y elaboración de medicamentos, como así también de las de envasado y rotulación con el objeto de comprobar total ausencia de microorganismos capaces de reproducirse. Incluye controles de los medios de cultivo empleados en las determinaciones y control higiénico de medicamentos terminados a fin de lograr que se ajusten microbiológicamente a las normas vigentes.

- Esta prueba se realiza para enumerar los microorganismos presentes en la muestra y comparar los límites de tolerancia establecidos.
- Inhibir el desarrollo de microorganismos de prueba.
- Verificar la presencia de conservantes.

**A- MÉTODO DE FILTRACIÓN**

Este método se utiliza principalmente para material oleoso, pomadas solubles, material de difícil disolución en medios de cultivo, polvos o suspensiones, que poseen propiedades antimicrobianas inherentes.

El aparato de filtración se arma en condiciones asépticas, las distintas partes se han esterilizado a vapor saturado a presión previamente.

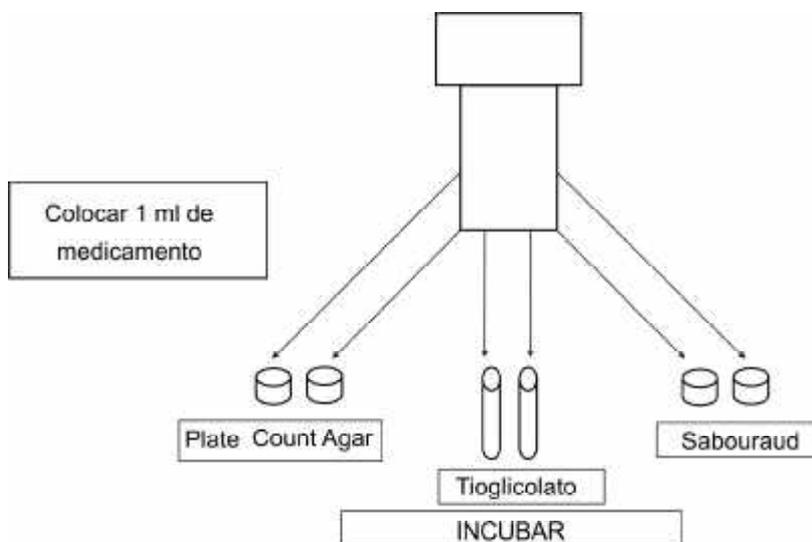
El medicamento investigado se disuelve en el líquido de dilución estéril y se filtra a través de membrana de 0,45- 0,20 μ de diámetro de poro, con una velocidad de flujo de 55 a 75 ml/ min y a una presión de 70 mm de Hg., con la finalidad de retener las posibles bacterias presentes en la muestra. Luego se toma asépticamente el filtro, se divide y se siembra en los medios de cultivo destinados a tal fin.

**B- MÉTODO: TRANSFERENCIA DIRECTA AL MEDIO DE CULTIVO**

Este método se utiliza para la mayoría de los medicamentos. Se toma 1 ml del medicamento y se inocular en los medios de cultivo correspondientes.

**DETERMINACIONES: RECUENTO STANDARD DE MICROORGANISMOS**

Tipos de Microorganismos	Técnica empleada	Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Interpretación
Aerobios mesófilos totales	Vertido en placa	Plate Count Agar	2 a 7 días	35°C	
Microaerofílicos- Anaerobios	Siembra líquido-líquido	Tioglicolato	2 a 7 días	35°C	
Hongos y levaduras	Vertido en placa	Sabouraud	2 a 7 días	30°C	



## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Enumeración de microorganismos presentes:

- Ausencia de desarrollo microbiano: se sugiere realizar la *prueba preliminar o control general*.
- Presencia de desarrollo microbiano.
  - a) Cotejar con los límites microbiológicos establecidos por salud pública.
  - b) Si superan los límites microbiológicos establecidos se sugiere: realizar las *pruebas definitivas y ensayos para evidenciar la presencia de microorganismos patógenos*.

## ENSAYO PRELIMINAR O CONTROL GENERAL

- Esta prueba se realiza para verificar la presencia de conservantes en la muestra.

La ausencia de desarrollo microbiano en el control de esterilidad puede ser atribuida a la actividad bacteriostática del producto en sí, o a la presencia de sustancias conservantes del medicamento.

### MICROORGANISMOS DE PRUEBA

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Candida albicans* ATCC 10231

Tomar asépticamente con pipeta despuntada 10 ml del medicamento de prueba, colocar en sendos tubos de ensayo estériles.

a.- Inocular asépticamente dos ansadas de cada una de las cepas patrón de referencia en sendos tubos de ensayo conteniendo 10 ml del medicamento de prueba. Incubar.

b.- Inocular asépticamente  $10^8$  UFC/ml de cada una de las cepas patrón de referencia con pipeta en sendos tubos de ensayo estériles conteniendo 10 ml del medicamento de prueba. Incubar.

### INTERPRETACIÓN

**La presencia de desarrollo microbiano puede ser atribuida a que:**

- El medicamento de prueba no presenta actividad bacteriostática.
- El medicamento de prueba no presenta sustancias conservantes.

Se recomienda realizar las pruebas definitivas.

### Determinación: Recuperación los microorganismos de prueba

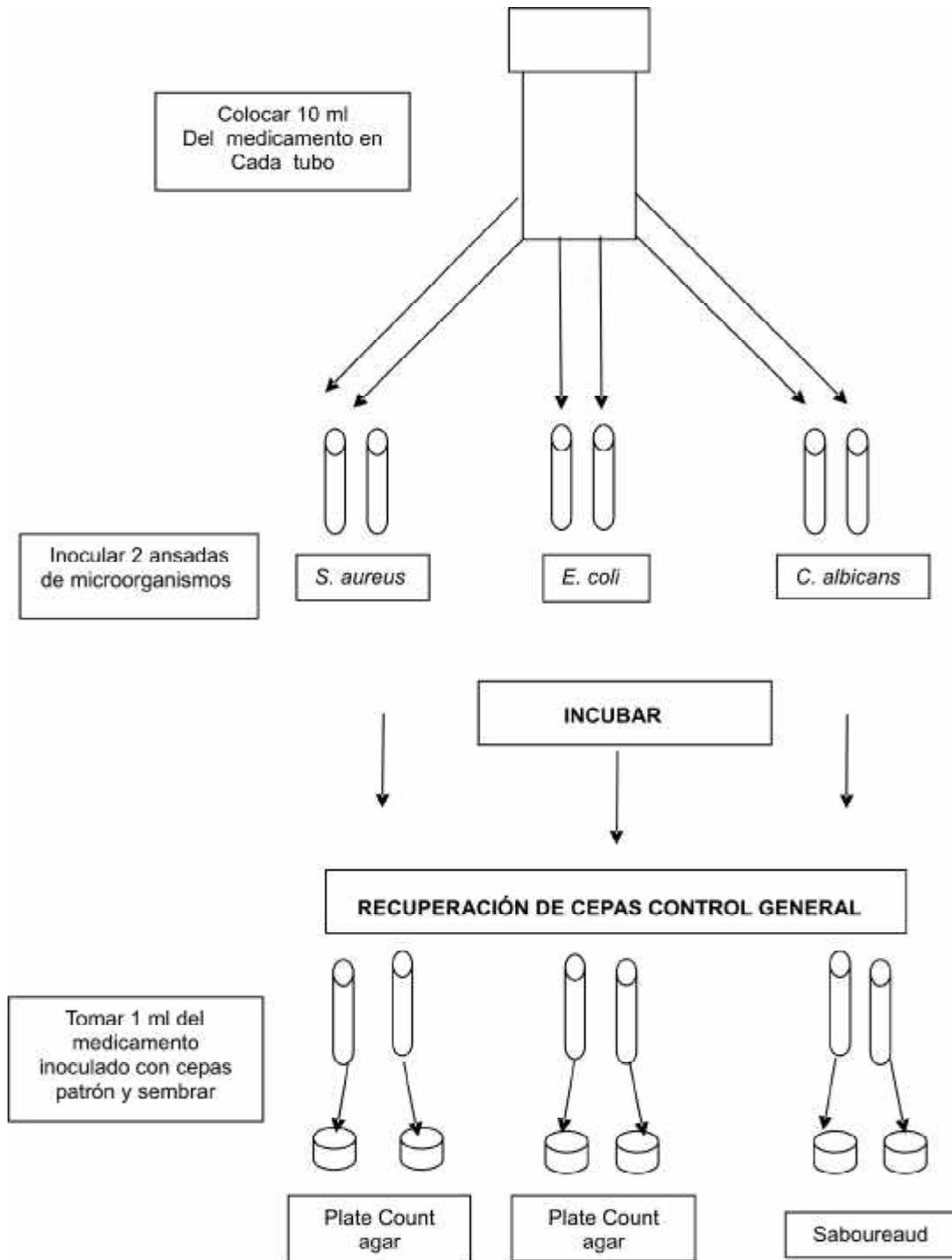
Microorganismos	Técnica	Medios de cultivo	Tiempo de incubación	Temp. de incubación	Interpretación
<i>Escherichia coli</i>	Vertido en placa	Plate Count agar	48 h	37°C	Presencia-ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vertido en placa	Plate Count agar	48 h	37°C	Presencia-ausencia
<i>Candida albicans</i>	Vertido en placa	Sabouraud	48 h	30°C	Presencia – ausencia

**La ausencia de desarrollo microbiano puede ser atribuida a:**

- La actividad bacteriostática del producto en sí.
- La presencia de sustancias conservantes.

Se recomienda realizar la modificación de la técnica.

## TÉCNICA DE CONTROL GENERAL



## MODIFICACIONES DE LA TÉCNICA

- Esta prueba se realiza con la finalidad de inactivar el conservante presente en la muestra.

Al no haber desarrollo microbiano en el control general o prueba preliminar y de corroborarse en las especificaciones del envase la presencia de un determinado conservante, deberá utilizarse alguna de estas *modificaciones de la técnica*.

### A. MÉTODO DE LA DILUCIÓN

Se repiten las pruebas usando las cantidades especificadas del material que se ensaya y volúmenes mayores del medio de cultivo, con el objeto de establecer la proporción de material y medio que no llegue a afectar al desarrollo de los microorganismos de prueba.

Si la cantidad especificada del material es bactericida o fungicida en 100 ml de medio de cultivo, *se disminuirá la cantidad del material* hasta encontrar la cantidad máxima que no afecte apreciablemente el desarrollo de los microorganismos de prueba en 100 ml de medio de cultivo.

Para líquidos y suspensiones, si la cantidad es menor de 1ml *se incrementa la cantidad de medio de cultivo* de manera que 1 ml resulte suficientemente diluido como para evitar la inhibición del desarrollo microbiano.

En el caso de sólidos, no solubles, ni dispersables si la cantidad es menor de 0,05 gramos *se aumentara la cantidad de medio de cultivo* de modo que la cantidad de material utilizado resulte lo suficientemente diluida para evitar la inhibición del desarrollo microbiano.

En cualquiera de los casos se usará para los ensayos de rutina las cantidades de material y medio de cultivo establecidos.

### B. MÉTODO DE LA FILTRACIÓN

Agentes antimicrobianos pueden eliminarse mediante el uso de membranas con tamaño de poros de hasta 470  $\mu\text{m}$ , método del lavado.

### C. MÉTODO DE INACTIVACIÓN DEL CONSERVANTE

Se adiciona el agente inactivante apropiado y estéril.

Si no se especifica qué conservante posee el medicamento, se procede al tratamiento general con una solución al 4% de polisorbato 80 (TWEEN 80) y/o una solución al 5 % de lecitina de soja.

## CONSERVANTES

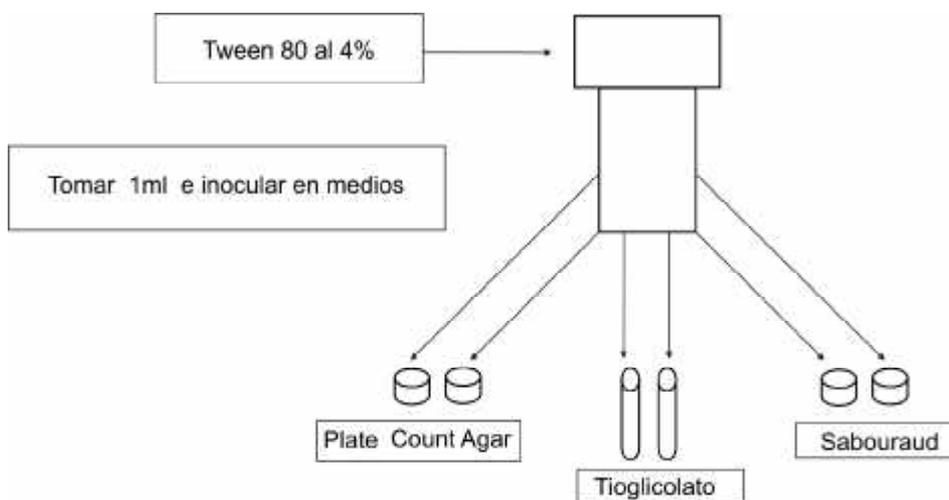
CONSERVANTE	ACCIÓN /GÉRMENES	DISMINUCIÓN DE ACTIVIDAD	pH	ESTERILIZACIÓN	USO
<b>Ac. benzoico. Ac. Bencenoicarboxílico</b> <b>Ac.Fenilcorboxílico</b> Ac. Fenilformico Carboxibenceno	Bacteriostático Gram positivos		Inferior a pH 5	Autoclave filtración	Orales Tópicos
Ácido sorbico	Antimicrobiano Antifúngico	Disminuye en presencia de tensioactivos no ionicos y en contacto con plásticos.			Líquidas y semisólidos
Alcohol bencilico Fenilcarbinol Fenilmetanol Alfahidroxitolueno	Bacteriostático Gram (+) Gram (-)	Disminuye su actividad en presencia de tensioactivos no ionicos (polisorbatos)	Límites amplios de pH	calor	Inyectables, Oftálmica, Óticos
Benzoato de sodio	Bacteriostático Fungistática		Inferior a pH 5		Vía tópica
Clorobutanol Clorbutanol	Antibacteriano Antifúngico  Activo Gram (+)	En presencia de polisorbato o polivinilpirrolidona disminuye su actividad			Colirios, Sol. Parenterales Liq.
Cloruro de Benzalconio	Virus y protozoos inactivo Gram (-)		Aumenta al aumentar pH	autoclave	Oftálmicos, Nasales, parenterales
Parahidroxibenzoatos	Antimicrobiano	Se reduce en presencia de tensioactivos no iónicos y por la unión a macromoléculas, coloides y agentes emulsificantes en general	Es activo a pH 3 a 6	autoclave	
Parahidroxibenzoato de Butil o Butilparabeno	Bacteriostático <i>E. coli Staphylococcus aureus</i> Antifúngico <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomices</i>		Su efectividad se reduce al aumentar el pH		Cosmética
Parahidroxibenzoato de Etilo Etilparabeno Protaben	Bacteriostático <i>Gram (-) G (+)</i> Fúngico <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomices spp.</i>		Su efectividad se reduce al aumentar el pH		
Parahidroxibenzoato de Metilo Nipagin M	Bacteriostático <i>Gram (-) G (+)</i> Fúngico <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomices spp.</i>		Su efectividad se reduce al aumentar el pH		
Parahidroxibenzoato de Propilo P. Nipagin Nipasol	Bacteriostático <i>Gram (-) G (+)</i> Fúngico <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomices spp.</i>		Su efectividad se reduce al aumentar el pH		

## TÉCNICA DE INACTIVACIÓN DEL CONSERVANTE

Transferir asépticamente los ml del inactivante (tween 80) que correspondieran al 4% del volumen de medicamento de prueba, agitar cuidadosamente, dejar actuar durante 30 minutos.

### DETERMINACIÓN: RECUENTO STÁNDAR DE MICROORGANISMOS

Técnica empleada	Medio de cultivo	Tipos de Microorganismos	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Interpretación N° de Microorganismos
Vertido en placa	Plate Count Agar	Aerobios mesófilos totales	2 a 7 días	37°C	
Siembra líquido-líquido	Tioglicolato	Microaerofilicos-Anaerobios	2 a 7 días	37°C	
Vertido en placa	Sabouraud	Hongos y levaduras	2 a 7 días	30°C	



### INTERPRETACIÓN

El desarrollo microbiano puede ser atribuido a la:

- Inactivación del conservante y/o a la presencia de contaminantes. Enumerar los microorganismos presentes y cotejar con los límites de tolerancia establecidos. Se recomienda realizar pruebas definitivas.

La ausencia de desarrollo microbiano puede ser atribuida a que:

- El inhibidor utilizado no es el adecuado y/o el medicamento de prueba no presenta contaminante.

## ENSAYOS DEFINITIVOS

- Se realizan teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la técnica de inactivación del conservante.

### A – RECuento TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES

En muestras suficientemente solubles y traslúcidas, utilizar el método A1, de lo contrario usar el método A2.

**A1- Recuento en placa:** si se espera que los productos estén altamente contaminados, diluirlo hasta que 1ml tenga entre 30 y 40 UFC/ml (unidades formadoras de colonias).

Como se supone que los productos poseen un índice bajo de contaminación, se debe sembrar directamente 1ml del producto en dos cajas de Petri estériles, adicionar 20 a 25 ml de medio agar nutritivo o Tripteína soya, previamente fundido y enfriado a 45°C, mezclar con movimientos rotatorios y dejar solidificar a temperatura ambiente, incubar 48 a 72 horas, contar el número de UFC que se desarrolle en cada caja, hacer un promedio de estos resultados y reportar el numero de UFC/ml o gramo de la muestra.

En el caso de haber diluido la muestra, el testigo de esta prueba consiste en colocar 1ml de diluyente en lugar de la muestra y proceder como se indica en el párrafo anterior. Si en estas cajas se observa desarrollo, la prueba debe repetirse usando nuevo diluyente.

**A2- Recuento en tubo:** colocar en 14 tubos estériles 9 ml de medio caldo nutritivo o caldo Tripteína soya, separar doce tubos y colocarlos en 4 hileras de 3 tubos cada una. Marcar una hilera de tubos como testigos. Colocar 1 ml de la muestra en cada uno de los tubos de la primera hilera de prueba y marcarlos como “100” y 1 ml a un tubo marcado con la letra “A”. Del tubo “A” pasar 1ml a un tubo adicional marcado con la letra “B” y a cada uno de los tubos de la segunda hilera marcarlos con el numero “10”. Del tubo “B” pasar 1 ml a cada uno de los tubos de la tercera hilera de prueba y marcarlos con el número “1”. Descartar los tubos “A” y “B”. Agitar todos los tubos e incubarlos.

Observar los desarrollos e interpretar los resultados empleando la TABLA que indica el número más probable de microorganismos mesófilos aeróbicos/ml o gramos de la muestra. Los tubos testigos no deben presentar desarrollo.

### B – RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS

Proceder como se indica en el método A1, utilizando medio agar Sabouraud en lugar de medio agar nutritivo, e incubar durante 5 a 7 días a 30°C.

### C – IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

#### Test de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Disolver 10 g o 10 ml de la muestra en agua peptonada buffer fosfato pH 7,2 hasta completar 100 ml, mezclar e incubar. Examinar el medio de desarrollo y si existe crecimiento, con la ayuda de un ansa ojal rayar la superficie de una placa de Petri con medio Agar Vogel- Johnson o Baird- Parker, Agar Manitol salado, Agar Cetrimide. Cerrar e invertir las placas.

**Incubar** 24 –48 h a 35°C.

**Interpretación:** si, transcurrido el tiempo de incubación, ninguna placa contiene colonias con las características listadas en la tablas siguientes para los medios de cultivo utilizados, el test de especímenes reúne los requerimientos para las cepas citadas.

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN MEDIOS SELECTIVOS AGARIZADOS**

Medio selectivo	Vogel- Jonson	Manitol Salado	Baird Parker
Morfología de la colonia	Negras rodeadas de zonas amarillas	Amarillas con zonas amarillas	Negras rodeadas de zonas claras de 2 a 5 mm.
Tinción Gram	Cocos positivos en racimo	Cocos positivos en racimos	Cocos positivos en racimos

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *PSEUDOMONA AERUGINOSA* EN MEDIOS SELECTIVOS AGARIZADOS Y DE DIAGNÓSTICO**

Medio	Agar cetrimide	Agar Pseudomonas Para detectar fluorescencia	Agar Pseudomona para detectar piocianina
Morfología de la colonia	Verdosa	Amarillentas	Verdosas
Fluorescencia con luz UV	Verdosa	Amarillentas	Azules
Test de oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo
Tinción Gram	Bacilos negativos	Bacilos negativos	Bacilos negativos

**TEST PARA *SALMONELLA SPP* Y *ESCHERICHIA COLI***

A la muestra contenida en un Erlenmeyer adicionar un volumen de medio lactosado hasta llegar a 100 ml, incubar. Examinar si el medio presenta desarrollo, agitar y con una pipeta tomar 1 ml del mismo e inocular en sendos tubos que contienen respectivamente 10 ml de caldos de enriquecimiento selectivo selenito-cistina y medio fluido tetratonato; homogeneizar. Incubar 12 h a 24 h (guardar el remanente de caldo lactosado).

**TEST PARA *SALMONELLA***

Tomar 1 ml de los caldos e inocular por duplicado en placas de Petri, luego agregar 25 ml de los medios agarizados selectivos bismuto sulfito y agar xilosa-lisina-dexosicolato realizar movimientos rotatorios.

**Incubar** 24-48 h a 35 °C.

**Interpretación:** Ver tabla. Si son bacilos Gram negativos, para identificarlos realizar una siembra en medio de transporte y luego inocular en TSI; incubar 24 h.

**Interpretación:** Alcalino/ácido con presencia de producción de sulfhídrico, presencia del Género.

**CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA DE *SALMONELLA SPP* EN MEDIOS SELECTIVOS**

Medio	Descripción de colonias
Agar verde brillante	Pequeñas, transparentes o rosadas con halo rojo
Agar xilosa- lisina- dexosicolato	Rojas, con centro negro
Agar bismuto-sulfito	Negras o verdes

**TEST PARA *ESCHERICHIA COLI***

Utilizar el caldo lactosado remanente. Tomar 1 ml e inocular por duplicado en placas Petri, verter el medio agar Mac Conkey con movimientos rotatorios.

**Incubar:** 24- 48 h a 35°C.

**Interpretación:** si las características no coinciden con la tabla ausencia de *E. coli* y sí coinciden proceder a su identificación sembrando para aislamiento en EMB.

**Incubación:** 24-48 h a 35°C.

**Interpretación:** Ausencia de brillo metálico no hay *E. coli*

Presencia de colonias con brillo metálico, presencia de *E. coli*. Realizar test confirmatorios.

**CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA DE *ESCHERICHIA COLI*. EN MEDIO MAC CONKEY**

Coloración Gram	Bacilos negativos
Morfología de la colonia	Rojas pueden tener un precipitado de bilis

**CONTROL HIGIENICO DE MEDICAMENTOS**

CATEGORÍA:

FECHA:

ANÁLISIS N°:

PRODUCTO:

LOTE N°:

FECHA VENCIMIENTO:

MICROORGANISMOS	LÍMITE DE TOLERANCIA	RESULTADOS
Aerobios mesófilos totales	$\leq 10^3$	
Mohos y levaduras	$\leq 10^2$	
Enterobacterias	$\leq 10^2$	
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	
<i>Pseudomona spp</i>	Ausencia	

Los resultados se expresan en número de gérmenes por gramo o mililitro de cada muestra.

OBSERVACIONES:

.....

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO 9

### MATERIALES:

Ansa ojal  
Gradilla  
Placas estériles  
Pipetas  
Tubos estériles  
Medio de cultivo: PCA; Sabouraud, Tioglicolato, A. Nutritivo  
Cepas Patrón (*E. coli*, *S. aureus*; *C. albicans*)

### MÉTODO:

Cada grupo realizará el ensayo de un medicamento a elección, teniendo en cuenta la secuencia detallada a continuación:

Control de esterilidad del medicamento: Método transferencia directa.

Ensayo preliminar o control general: Método inoculación de cepas patrón.

Modificación de la técnica: Método inactivación del conservante.

Ensayos definitivos: recuento de aerobios mesófilos totales, anaerobios, hongos y levaduras.

Identificación de patógenos.



## ANEXO

### FARMACOPEA ARGENTINA

#### A- CONSERVADORES QUE PUEDEN EMPLEARSE EN CUALQUIER CONCENTRACIÓN

Ácido ascórbico (todas las vías)  
Ácido izo ascórbico (todas las vías)  
Palmitato y ascorbato de ascorbilo (todas las vías)  
Ácido propionico (todas las vías menos la ocular)  
Ácido sórbico (todas las vías)  
Glicerina (todas las vías menos la ocular)  
Tocoferoles (todas las vías)

#### B- CONSERVADORES QUE PUEDEN EMPLEARSE CON LÍMITE DE CONCENTRACIÓN

Alcohol etílico (concentración máxima 20% V/V todas las vías menos parenteral).  
Anhídrido sulfuroso, sulfitos, bisulfitos y metabisulfitos. Concentración máxima 1 por mil calculada en anhídrido sulfuroso.  
Ácido benzoico, benzoato de sodio concentración máxima 2 por mil calculada en ácido benzoico.  
Ácido p-hidroxibenzoico, sus ésteres metílicos, etílicos, y propílicos y los derivados sódicos de esos ésteres. Concentración máxima 1,5 por mil para cada uno de esos productos o para una mezcla de varios de ellos.  
Ácido nordihidroguaiarético. Concentración máxima 1 por diez mil.  
Butilhidroxianisol. Concentración máxima uno por cinco mil.  
Butilhidroxitolueno. Concentración máxima 1 por diez mil.  
Galato de octilo. Concentración máxima 1 por diez mil.  
Galato de dodecilo. Concentración máxima 1 por diez mil.  
Fenol. Concentración Máxima 5 por mil en soluciones inyectables cuya esterilización no puede efectuarse por acción del calor.  
Cresol. Concentración máxima 3 por mil en soluciones inyectables cuya esterilización no puede efectuarse por acción del calor.  
p-cloro m-cresol. Concentración máxima 3 por mil en soluciones inyectables cuya esterilización no puede efectuarse por acción del calor.

#### C- OTROS CONSERVANTES QUE PUEDEN EMPLEARSE

También pueden agregarse a los medicamentos siempre que se respete cualquier disposición reglamentaria que rige la preparación de especialidades farmacéuticas.

Acido tetracémico y sus derivados.  
Clorobutol.  
Hidroxi metano sulfinato de sodio.  
Hidroxi quinoleina y sus sales.  
Derivados organomercuriales: acetato, borato y nitrato de fenilmercurio, ortocloromercurifenol y etilmercuritiosalicilato de sodio.

## EXCIPIENTES DE USO FARMACÉUTICO

Todo fármaco, para poder ser administrado a un organismo, debe ser dotado de una *forma farmacéutica* que lo convierta en medicamento. Para ello, es normalmente imprescindible el empleo de una serie de sustancias sin actividad terapéutica que, adicionadas al fármaco o principio activo, den lugar a la forma farmacéutica deseada: se trata de los excipientes.

Clases de excipientes

- Conservantes
- Colorantes
- Edulcorantes
- Aromatizantes
- Otros

### CONSERVANTES:

Se emplean para conservar o mantener las características del medicamento el mayor tiempo posible, evitando contaminaciones microbianas y/o fúngicas, oxidaciones y otras alteraciones, para lo cual se emplean, respectivamente, sustancias antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y agentes complejantes.

Conservantes antimicrobianos y/o antifúngicos:

**Ácido benzoico:** antimicrobiano bacteriostático, también conocido como Ácido Benzenocarboxílico, Ácido Fenil carboxílico, Ácido Fenilfórmico y carboxibenceno.

Presenta una moderada actividad antimicrobiana frente a gérmenes G<sup>+</sup> y poca actividad frente a G<sup>-</sup>, siempre y cuando el pH sea inferior a 5 (a pH superiores su actividad como antimicrobiano es nula).

El ácido Benzoico suele utilizarse en preparaciones orales (ej.: jarabes, comprimidos, etc.) y de aplicación tópica, (sobre piel y/o mucosa) siendo la concentración máxima permitida del 0.2% (normalmente se emplean concentraciones que van del 0.05% al 0.1%).

En cuanto a su efecto clínico, es una sustancia irritante ocular (no emplear en colirios), irritante de mucosas y piel, en este último caso en tratamientos prolongados.

**Ácido sórbico:** agente antimicrobiano y antifúngico, activo frente a bacterias. Levaduras y hongos.

Su actividad disminuye en presencia de tensioactivos no iónicos (Tween) y en contacto con plásticos. Debe tenerse en cuenta que es muy sensible a la oxidación, tanto en solución acuosa como en forma sólida (especialmente en presencia de luz), por lo que es aconsejable su estabilización con la adición de antioxidantes fenólicos como el galato de propilo (0.02%). Los preparados con ácido Sórbico en su composición deben almacenarse en recipientes herméticos, protegidos de la luz, a una temperatura no superior a 15°C y nunca llevar en su composición agentes oxidantes.

Se emplea como conservante de preparaciones líquidas y semisólidas (ej.: ungüentos) a la concentración de 0.05% al 0.2%, normalmente en combinación con otros agentes antimicrobianos o con glicoles. Estos presentan un efecto sinérgico sobre el ácido Sórbico, aumentando su potencia antimicrobiana.

**Alcohol bencílico:** antimicrobiano antiséptico, anestésico local y solvente, suele denominarse también fenilcarbinol, fenilmetanol y alfa-hidroxitolueno. Es moderadamente activo frente a G<sup>+</sup> y menos activo frente a G<sup>-</sup>; inactivo frente a esporas, pero sí actúa frente a ellas cuando son activadas por aplicación de calor. Toda su actividad puede desarrollarse frente a límites amplios de pH. Es incompatible con agentes oxidantes y ácidos fuertes, disminuyendo su actividad frente a tensioactivos no iónicos (Tween).

Se usa como conservante en soluciones acuosas y oleosas en concentraciones del 2% y en colirios (normalmente de cortisona) al 0.9%. No se emplea en preparados de uso oral por sus caracte-

rísticas organolépticas, siendo empleado en preparados inyectables, soluciones oftálmicas (colirios), aerosoles y productos óticos.

**Benzoato sódico:** antibacteriano y antifúngico, se emplea al 0.1% como conservante en lugar del ácido Benzoico, debido a su mayor hidrosolubilidad, si bien solo es eficaz a pH inferiores a 5, pues la acción bacteriostática y fungistática es desarrollada por el ácido libre.

Es incompatible con sales férricas, cálcicas, de metales pesados, plata, mercurio y plomo.

Suele emplearse en las formas farmacéuticas de administración por vía tópica (sobre la piel y/o mucosas) a la concentración del 0.05-0.1%, siempre que el pH sea inferior a 5.

**Clorobutanol:** agente antibacteriano y antifúngico, también conocido como clorbutanol.

Es efectivo contra microorganismos G+ y G-, teniendo actividad bacteriostática y no bactericida. Es especialmente efectivo frente a *Staphylococcus albus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

Debe tenerse en cuenta que su estabilidad en medio neutro o alcalino es baja, no debiendo emplearse a pH superior a 4, asimismo es muy lábil frente al calor, destruyéndose totalmente en la esterilización en autoclave.

En presencia de polisorbatos (agentes tensioactivos no iónicos) y polivinilpirrolidona disminuye su actividad; sin embargo, los alcoholes aromáticos, que también incrementan la solubilidad del Clorobutanol, son sinérgicos con él desde el punto de vista antimicrobiano.

Se suele utilizar como conservante en colirios y soluciones parenterales (sueros, soluciones de dextrosa, etc.) al 0.5%.

**Cloruro de Benzalconio:** antimicrobiano, agente humectante solubilizador y antiséptico, es activo frente a microorganismos G+ pero inactivo frente a G- y algunas cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *Micobacterium tuberculosis*, y otros. Es relativamente inactivo frente a esporas y mohos pero es activo frente a algunos virus, hongos y protozoos. Su actividad aumenta al aumentar el pH. Siendo óptima en el intervalo de pH que va de 4 a 10.

Su actividad puede verse disminuida si las soluciones diluidas se envasan en recipientes de cloruro de polivinilo o de poliuretano.

Sus aplicaciones farmacéuticas se centran en los productos oftálmicos, (concentraciones de 0.01-0.02%), productos nasales y óticos (0.002-0.02%), productos parenterales de pequeño volumen (0.01%) y preparados líquidos de administración tópica en concentraciones de 0.1 – 0.3%.

**Parahidroxibenzoatos:** las propiedades antimicrobianas de todos los parahidroxibenzoatos se reducen en presencia de tensioactivos no iónicos y por la unión a macromoléculas, coloides y agentes emulsificantes en general.

Todos los parahidroxibenzoatos son estables a pH entre 3 y 6, pueden ser esterilizados por calor húmedo a 120°C durante 20 minutos sin descomponerse; en dicho preparado son estables 4 años a temperatura ambiente (se descompone menos del 10%), pero en preparados acuosos de pH > 8 se hidrolizan rápidamente.

**Parahidroxibenzoato de Butilo:** antimicrobiano bacteriostático también denominado butilparabeno. Es activo frente a un gran número de microorganismos, entre los que cabe destacar, *Aerobacter aerogenes*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus var mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus nigricans*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus*, si bien su efectividad disminuye al aumentar el pH.

El butilparabeno se utiliza en preparados farmacéuticos y cosméticos al 0.1% solo o en combinación con otros ésteres del parahidroxibenzoico, en cuyo caso aumenta el efecto conservante.

**Parahidroxibenzoato de etilo:** Agente antimicrobiano también denominado etilparabeno, Etil Chemosept, betacise, E. Napabutyl y Protaben. Es activo frente a gran número de microorganismos entre los que cabe destacar: *Aerobacter aerogenes*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus var mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus nigricans*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana disminuye al aumentar el pH.

**Paraidroxibenzoato de metilo:** agente antimicrobiano también denominado metilparabeno, Metil chemosept, Metil parasept, Nipagin M y solbrol.

Es activo frente a *Aerobacter aerogene*, *Aspergillus aryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus var mycicides*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Penicillium digitatum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa*, *Rhizopusnigricans*, *Sacharomyces cereviciae*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *trichinodermalignorum*. El metilparabeno es particularmente efectivo frente a bacterias, aunque es menos efectivo frente a hongos.

Se utiliza como conservante en todo tipo de preparados farmacéuticos y cosméticos bien solo (concentraciones del 0,025- 1,5%) o en combinación con parahidroxibenzoato de propilo a las concentraciones del 0.1% en el primero y 0.02% el segundo (típica combinación muy usada actualmente, de gran acción conservante antibacteriana y antifúngica).

**Parahidroxibenzoato de propilo:** agente antimicrobiano conocido también con el nombre de propilparabeno, Propyl chemosept, Propyl parasept, betacide P. Nipagin P, y Nipasol.

Es activo frente a *Aerobacter aerogenes*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus var mycocides*, *Bacillus subtilis*, *Candida Albicans*, *Escherichia coli*, *Penicillium digitatum*, *Pseudomona aeruginosa*, *Rhizopus nigricans*, *Sacharomyces cerevisiae*, y *staphylococcus aureus*. Es tan eficaz para frenar el desarrollo de las bacterias como de los hongos, si bien su actividad disminuye al aumentar el pH debido a la formación del anion fenolato. Se emplea en todo tipo de preparación farmacéutica y cosmética en concentraciones que van del 0.05% al 0.25% si se encuentra solo. Es muy utilizada su combinación con el Parahidroxibenzoato de metilo.

## ANTIOXIDANTES

Hidroquinona, Ácido Galico y ésteres de ácido Galico, Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Ac norhidroxiguayeretico (NDGA), Tocoferoles o vit. E, Palmitato de ascorbilo y ésteres del ácido Ascorbico, Compuestos sulfurados (sulfito, bisulfito y metasulfito de sodio).

## COLORANTES

Curcumina, tartracina, amarillo de quinoleina, eritrosina, xantofilas y antocianinas, etc.

## EDULCORANTES

Sacarina, sorbitol, Ciclamato sódico, Aspartame, etc.

## AROMATIZANTES

Mentol, etilvainillina, glutamato sódico, esencias, etc.

## SUSTANCIAS BACTERIOSTÁTICAS Y ANTIFÚNGICAS

En un medicamento es imprescindible el empleo de una serie de sustancias sin actividad terapéutica que son adicionadas al fármaco en forma de excipientes como los *conservantes*.

Los conservantes se emplean para mantener las características del medicamento el mayor tiempo posible, evitando contaminaciones microbianas, fúngicas y otras alteraciones.

Para lo cual se emplean sustancias antimicrobianas, antifúngicas como:

**Ácido Benzoico:** Antimicrobiano frente a gérmenes Gram positivos y menos activo frente a Gram negativos.

**Alcohol Bencílico:** Antimicrobiano antiséptico frente a gérmenes Gram positivos y menos activos frente a Gram negativos, inactivo para esporas.

**Benzoato Sódico:** Fúngistático y bacteriostático.

**Clorbutanol:** Efectivo bacteriostático contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

**Cloruro de Benzalconio:** Antimicrobiano activo frente microorganismos Gram positivos e inactivo frente microorganismos Gram negativos.

**Parahidroxibenzoatos:** Todos presentan propiedades antimicrobianas.

**Parahidribenzoato de Butilo o Butilparabeno:** Bacteriostático frente a *Candida albican*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, entre otros.

**Parahidribenzoato de Etilo o Etilparabeno:** Es activo frente *Klebsiella neumoniae*, *Aspergillus niger*, *Candida albican*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros.

**Parahidroxibenzoato de Metilo o Nipagin M y Solbrol:** Es activo frente a *Aerobacter aerogenes*; *Aspergillus orizae*; *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pruteus vulgaris* *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

**Parahidroxibenzoato de Propilo o Nipagin P y Nipazol:** Es activo bacteriostático y fungistático frente a *Aerobacter aerogenes*; *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.



## TRABAJO PRÁCTICO 10

### DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE FENOL

#### OBJETIVOS

- *Determinar el poder bactericida de un desinfectante.*
- *Valorar la utilidad de la determinación de la eficacia de los distintos desinfectantes.*

### INTRODUCCIÓN:

La existencia de numerosos productos químicos provistos de poder germicida, ha hecho necesario adoptar métodos para determinar su eficacia. Para poder elegir acertadamente los desinfectantes, es preciso tener una unidad de medida a que referirse.

Se han ideado varios métodos para probar el valor bactericida de un desinfectante. Ningún método es satisfactorio para todas las sustancias o para cualquier estado en que se empleen.

#### Alguno de ellos son los siguientes:

- Coeficiente Fenol
- Método del Papel de Filtro húmedo
- Método del Papel de Filtro seco
- Método de la Placa de Agar
- Método de la placa de Agar / Suero
- Método de los Cilindros y Placa de Agar
- Pruebas en presencia de materia orgánica

### DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE FENOL

Es uno de los métodos más antiguos elaborado para emplearse solamente en la comparación de compuestos que actúan en bacterias en la misma forma que lo hace el fenol, esto es, cresoles y otros derivados u homólogos mayores del fenol.

Este método se aplicó después a sustancias químicas que actúan por otros mecanismos, y de ello se obtuvo y publicó gran cantidad de datos inútiles y desorientadores.

El conocimiento cabal de lo anterior condujo a la introducción de otros métodos de valoración.

El *coeficiente fenol* de un desinfectante puede definirse como la relación del poder germicida del desinfectante en cuestión comparado con el del fenol, determinado en condiciones fijas.

Esta prueba está aceptada como método oficial en la mayoría de las farmacopeas y es de aplicación internacional.

Es obvio, por lo tanto, que los factores más importantes de tal determinación dependen de las condiciones en que se hace la prueba.

#### CONDICIONES RECOMENDADAS PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE FENOL:

El Ministerio de Agricultura de los EE.UU. redacta las condiciones en que debe determinarse el coeficiente fenol y demás pruebas germicidas. A ella nos adaptamos en esta descripción.

- 1) Elección del microorganismo: *Salmonella typhi* , y *Staphilococcus aureus*.
- 2) Composición del medio:
 

Extracto (Liebig) de carne bovina	5g
NaCl	5g
Peptona	10g
Agua Destilada	1000cc
- 3) Acidez del medio: pH 6,8
- 4) Cantidad de Medio de Cultivo por tubo: 10 ml
- 5) Solución madre de Fenol al 5 %. Debe cumplir los requisitos de la Farmacopea de EE.UU. y, además, su punto de solidificación no debe ser inferior a 40 °C.
- 6) Cantidad de cultivo añadido a los desinfectantes diluidos: 0,5 a 5 ml.
- 7) Resistencia del cultivo de prueba al fenol (diluciones que matan en 10 minutos pero no en 5): 1/90.
- 8) Condiciones del tubo de prueba: cerrado con tapón de algodón
- 9) Temperatura de Prueba: 20°C
- 10) Intervalos cronológicos de la prueba: 5, 10 y 15 minutos.
- 11) Cantidad de producto transferido (magnitud del asa de platino): ojal de 4 mm
- 12) Cálculo del Coeficiente fenol: la dilución más alta que no mata en 5 minutos, pero si en 10 minutos, dividida por la correspondiente del fenol.

**EL CÁLCULO DEL COEFICIENTE FENOL PUEDE EXPRESARSE CLARAMENTE ASÍ:**

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
Desinfectante X			
1/300			
1/325			
1/350			
1/370			
1/400			
Fenol			
1/90			
1/100			

Es evidente que la dilución más alta de desinfectante X, que no mata en 5 minutos, pero si en 10, es 1/350; por lo que respecta al fenol es 1/90.

El coeficiente fenol sería  $350/90 = 3,89$ .

Para evitar la impresión de una supuesta exactitud, el coeficiente fenol se calcula hasta la décima, a menos que sea inferior a la unidad, de tal manera que en el caso anterior sería 3,9.

## DESARROLLO DE TRABAJO PRÁCTICO 10

El desinfectante que debe probarse se diluye en agua o solvente adecuado, y las diluciones se ordenan en tubos pequeños, en una serie de diluciones crecientes (a concentraciones decrecientes). A cada tubo se agrega una cantidad especificada (generalmente este volumen es del 10% del volumen de la dilución antiséptica que contiene cada tubito) del microorganismo de ensayo en un cultivo en caldo.

Resulta práctico adoptar los siguientes volúmenes:

5 ml de dilución de antiséptico a probar y agregar 0,5 ml de un cultivo de *S. aureus* de 24 h de incubación a 37°C en un caldo de composición antes citada.

Al final de períodos fijos, exactamente medidos (5 minutos, 10 minutos, y 15 minutos), se retira con pipeta estéril 0,5 ml de la mezcla de cultivo y antiséptico diluido, y se siembra en superficie de sendas placas de petri, con agar nutritivo y se incuban a 37°C por 24 horas.

Se pueden usar también tubos con caldo glucosado en lugar de medio sólido. Si no aparece crecimiento en el subcultivo (colonias en el agar o turbidez en el caldo glucosado) indican que el microorganismo ha sido destruido.

*La mayor dilución (es decir, la concentración más débil) del antiséptico que destruya al S. aureus en un tiempo dado, se divide por la mayor dilución de fenol que destruye en el mismo tiempo. Esta relación es el COEFICIENTE FENOL.*

### MATERIALES Y MÉTODOS:

Materiales necesarios:

- ansa ojal
- pinzas metálicas
- placas estériles
- pipetas
- tubos estériles
- solución fisiológica estéril
- microorganismos de ensayo
- patrón de turbidez (sn BaCl<sub>2</sub> )
- cepas control (E. coli, S. aureus, Ps. aeruginosa)
- tubos estériles para diluciones
- Hexaclorofeno
- Fenol
- gradillas suficientes
- mechero Bunsen
- estufas de incubación a 37°C
- cronómetro

**PREPARAR LAS DILUCIONES DEL FENOL, SEGÚN EL ESQUEMA SIGUIENTE:**

DILUCIONES	5 minutos	10 minutos	15 minutos
FENOL			
1:90			
1:100			
1:110			
HEXACLOROFENOL			
1:250			
1:300			
1:350			

- Transcurridos los tiempos de contacto, proceder a la siembra en caldo según indica la técnica.
- Incubar.
- Interpretar los resultados.
- Realizar informe.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bailey y Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª Ed. Editorial Medica Panamericana, 1989.
- Baker, F.J. *Manual de Técnica bacteriológica*. Editorial Acribia. 1970.
- Basualdo, J.A.; Coto, C.E.; De Torres, R.A. *Microbiología Biomédica*. Ed. Atlante. Bs. As. Arg. 1996.
- Bidou y Grupillo. *Manual de esterilización*. 1983.
- Blando, A. M. y col. *Manual de Prácticas en Higiene y Microbiología*. Fac. Cs. Ex., Qcas. y Nat. Univ. Nac. de Córdoba.
- Branson, D. *Métodos en Bacteriología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. 1974.
- Britania. *Catálogo de Medios de cultivo microbiológicos*. Laboratórios Britania. Bs. As., Arg. 1999/2000.
- Brock, T.D. y col. *Biología de los microorganismos*. 6º/7º ed. Ediciones Omega. España, 1994/1997.
- Brock, T. D.; Madigan, M. T. *Microbiología*. Sexta edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 1993.
- Buchanam, S.R.E. Gib, N.E. *Bergey Manual of Determinative Bacteriology*. Tomos I y II. Ed. Editorial Williams and Wilkins. Baltimore. 1998.
- Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. *Microbiología. Manual de Métodos Generales*. 2º edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 1992.
- CLSI CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2006.
- Davis, D. B.; Dulbecco, R.; Eisen, H.; Ginsberg, H. *Tratado de Microbiología*. 5ª ed. Salvat Editores, 3ª edición, 1986.
- Diccionario Médico. 10ª Ed., Editorial Salvat. 1972 u otra actualizada.
- Farmacopea Nac. Argentina. 1º Vol. VII ed. Decreto 22/2003. Imprenta del Boletín Oficial, Bs. As. 2003.
- Fauli, Trillo y col. *Tratado de Farmacia Galénica* 1ª Ed. - 1993.
- Guía de TP. INEI ANLIS Malbrán: Curso intensivo de antimicrobianos, 2005.
- Jawets, E.; Melnick, J.; Adelberg, E. *Manual de Microbiología Médica*. Ed. del manual moderno. Mexico. 1998.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; William, M.; Schreckenberger, P. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas*. 5º ed. Editorial Médica Panamericana. 2003.
- Koneman, E. W. y Roberts, G. D., *Micología Práctica de Laboratorio*. 3º ed. Bs. As. Ed. Médica Panamericana. 1987.
- Lenette y Ballows. *Manual de Microbiología Clínica*. 3 y 4a. American Microbiology Society. 2004. Ed. Editorial Acribia. España. 1998.

- Mac Faddin, J. F. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1980.
- Manual de Procedimientos de Laboratorios y Productos BBL. Buenos Aires. Argentina. 1974.
- Manual Merck de medios de cultivos. Merck Laboratorios. Bs. As. Arg. 1982/1985/1990.
- Merchant – Packer. *Bacteriología y Virología Veterinarias*. 3° Edición . Ed. Acribia. España. 1975.
- Murray, P.; Kobayashi, G. *Microbiología Médica*. 2° ed. Editorial Hartcourt Brace. España. 1997.
- Murray, P.; Rosenthal, K.S.; Kobayashi, G.; Pfaller, M. *Microbiología Médica*. 4° ed. Ed. Elsevier Science. 2003.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*; sixth edition, 2004; M7-A6. Wayne, Pa, USA.
- Pintos, J. C. *Manual de esterilización Moderna*. Ed. Zanetti. 1970.
- Pumarola y col. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editores Salvat. 1985
- Regminton. *Farmacia Tomo I y II*.
- Romero Cabello. *Microbiología y Parasitología Humana*. 2° ed. Editorial Médica Panamericana. 1999.
- Schaechter, G. M.; Barry, L. E.; Guerra, H. *Microbiología. Mecanismo de las enfermedades infecciosas*. 2° ed. Editorial Medica Panamericana. 1994.
- Seymour, S. B. *Desinfection, Sterilization and preservation*. Editorial Lea&Febiger. 1991.
- Stanier, R. V.; Adelberg, E. A.; Ingraham, I. L. *Microbiología*. 5° ed. Editorial REPLA. 1998.
- Stanier, Doudoroff y col. *Microbiología*. 4a ed. Editorial Aguilar. 1986.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1993.
- WHO. Laboratory Biosafety Manual. Geneva. U.S.A. 1983.
- Zinsser y col. *Microbiología*. 20° ed. Editorial Médica Panamericana. 1998.

#### **ENLACES VIRTUALES**

- Cátedra de Microbiología. Carrera de Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. <http://www.fceqyn.unam.edu.ar>
- Cátedra de Higiene. Universidad de Uruguay. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2026.pdf>
- Palavecino Rosales, E. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia, Universidad Católica de Chile. 1997; 26:156-160. URL: [http://www.britanialab.com.ar/k07\\_04.html](http://www.britanialab.com.ar/k07_04.html)
- Servidor educativo. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. España. <http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/entrada.html>