

# **Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología e Inmunología**

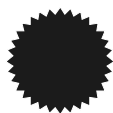
1º Parte

Carrera Licenciatura en Genética  
Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales

UNaM

Medvedeff, Martha G.  
Jerke, Gladis  
Horianski, Marta A.  
Amer, Lidia  
Bargardi, Severino

2006



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:** Nicolás Capaccio

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

**Corrección:** Hedda Giraudo

Guía de trabajos prácticos : Cátedra de Microbiología e Inmunología /  
coordinado por Martha Medvedeff - 1a ed. - Posadas : EdUNaM -  
Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones, 2006.  
92 p.; 30x21 cm.

ISBN: 950-579-052-X

1. Microbiología Clínica. I. Medvedeff, Martha, coord.  
CDD 616.01

ISBN: 950-579-052-X

ISBN: 13:978-950-579-052-4

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Universidad Nacional de Misiones

Posadas, 2006

## ÍNDICE

Trabajo Práctico N° 1 Seguridad, bioseguridad y áreas biolimpias en los laboratorios biológicos. Preparación de material .....	5
Trabajo Práctico N° 2 Métodos de esterilización. 1° Parte. Esterilización por calor húmedo .....	13
Métodos de esterilización. 2° Parte. Esterilización por calor seco .....	21
Trabajo Práctico N° 3 Métodos ópticos para el examen de las muestras. Examen microscópico directo. ....	29
Trabajo Práctico N° 4 Métodos ópticos para el examen de las muestras. Técnicas de coloración. Gram. ....	35
Trabajo Práctico N° 5 Métodos ópticos para el examen de las muestras. Coloración de Ziehl-Neelsen .....	43
Trabajo Práctico N° 6 Medios de cultivos (1° parte) .....	47
Trabajo Práctico N° 7 Medios de cultivos (2° parte) .....	53
Trabajo Práctico N° 8 Siembra y aislamiento de microorganismos .....	61
Trabajo Práctico N° 9 Identificación de Bacilos Gram negativos. Identificación de Enterobacterias .....	73
Trabajo Práctico N° 10 Identificación de Cocos Gram positivos aerobios .....	85



## Trabajo Práctico N° 1

### SEGURIDAD, BIOSEGURIDAD Y ÁREAS BIOLIMPIAS EN LOS LABORATORIOS BIOLÓGICOS. PREPARACIÓN DE MATERIAL

#### INTRODUCCIÓN

Todos los procedimientos analíticos, de investigación y docencia utilizados en el laboratorio de Microbiología entrañan un riesgo a menudo indeterminado. Asimismo, el uso de nuevas técnicas, reactivos químicos y biológicos y aparatos requiere de conocimientos especiales, instrucción y supervisión adecuados para evitar accidentes. De igual manera, se entiende que en los laboratorios se desempeña personal de diferentes características culturales y técnicas y, por lo tanto, se debe asumir que no todos poseen los conocimientos de seguridad y bioseguridad necesarios para trabajar en un área determinada. El resultado de un error puede ser perjudicial para el operario, así como para otro personal del laboratorio o para el medio ambiente exterior.

#### DEFINICIONES

**Seguridad y bioseguridad:** se pueden concebir como la identificación de los riesgos y los factores concomitantes en una determinada área de laboratorio, para así determinar las medidas preventivas y evitarlos.

**Seguro:** exento de todo peligro.

**Bio-seguridad:** protección de la vida. Se logra, en parte, evitando accidentes.

**Prevención:** se basa en el conocimiento del peligro y el modo de evitarlo.

#### AGENTES DE RIESGO

La OPS define como riesgo, en términos generales, una probabilidad para que se produzca un daño en un individuo o grupo poblacional en un área geográfica determinada. Esta definición puede aplicarse al riesgo en el trabajo de laboratorio, considerándose como área geográfica las instalaciones propias del laboratorio. Los agentes de riesgo en un laboratorio biológico pueden ser:

- Biológicos: virus, bacterias, clamidias, rickettsias, parásitos u hongos.
- Químicos: ácidos, bases, toxinas: animales o vegetales, etc.
- Físicos: térmico (calor, frío), mecánico (traumas), eléctrico, radiación ionizante, etc.

La operación en los laboratorios determina riesgos tanto dentro como fuera de sus instalaciones. El personal de un laboratorio de cualquier naturaleza está expuesto a los siguientes tipos de riesgo intralaboratorio:

- Infecciones
- Quemaduras
- Intoxicaciones
- Traumatismos
- Explosiones
- Irradiación

El riesgo de infección necesita alguna de las siguientes rutas de exposición: contacto directo, inhalación, ingestión e inoculación o inyección.

#### FACTORES DE RIESGO EN LOS LABORATORIOS

Se consideran factores de riesgo las circunstancias ambientales y operativas que están relacionadas con la causalidad de los accidentes que exponen a las personas a los diferentes agentes de enfermedad. Un accidente puede ser el resultado de una causa determinante (ej. dejar caer un frasco de cultivo), aunque con frecuencia hay causas concomitantes que contribuyen directa

o indirectamente a ocasionar el accidente o la exposición a agentes de riesgo para el personal de laboratorio (ej. sobrecarga de equipamiento que impide el tránsito libre del personal). La identificación de los posibles factores de riesgo es, sin duda, fundamental para prevenir los accidentes y exposición a infecciones.

#### **INSTALACIONES INADECUADAS**

1. *Distribución de ambientes.* El diseño y distribución de ambientes puede ser incompatible con ciertas actividades. La ventilación e iluminación deficientes son factores de riesgo; pisos y paredes porosas de difícil limpieza, falta de sistemas de eliminación de desechos.

2. *Distribución y ubicación de los equipos.* La aglomeración de equipos en una sala y la pobre distribución que impide la libre circulación del personal, son factores importantes de riesgo de accidentes en los laboratorios.

**Falta de planificación de actividades:** esto conduce a la improvisación, a la utilización de métodos inseguros y a la observación de conductas impropias.

**Impedimentos físicos humanos:** se consideran riesgos para infecciones de laboratorio, las enfermedades crónicas, alérgicas o estados inmunodepresivos, mareos, debilidad o cualquier otro problema de salud que puede disminuir la capacidad física de las personas.

**Conocimiento o actitud mental:** las faltas de conocimiento, de atención o de concentración sobre una técnica o procedimiento de laboratorio pueden convertirse en riesgos. Se consideran en igual forma, la inhabilidad para trabajar con otras personas, el mal carácter, miedo, excitación o acciones impulsivas o involuntarias.

**Elementos ajenos a la organización:** se consideran en este grupo: animales silvestres, insectos, vientos, inundaciones, rayos, terremotos, etc.

#### **PUNTOS FOCALES DE RIESGO**

Se consideran como puntos focales de riesgo, aquellos aspectos, sectores o actividades que ofrecen mayores posibilidades para que ocurran accidentes causantes de daño para los laboratoristas y/o para los grupos comunitarios y fauna circundantes. Es precisamente en estos puntos donde deben concentrarse las medidas de seguridad y bioseguridad para reducir los riesgos. Estos puntos son:

**Técnicas y prácticas de laboratorio.** Se refiere a los siguientes aspectos:

- Producción de aerosoles
- Roturas y derrames
- Uso y manejo de animales de laboratorio
- Falta de manejo de la técnica que perjudica a sí mismo y a los que trabajan en el mismo lugar.

#### **Actitudes del personal**

- Hábitos de comer, beber y fumar en el laboratorio
- Uso de ropas inadecuadas
- Higiene y orden en el trabajo del laboratorio
- Ignorancia, falso coraje, imprudencia, autosuficiencia
- Pereza, temor, miedo, distracciones, irresponsabilidad
- Malas posturas o hábitos

#### **Organización y administración**

- Acceso no controlado, falta de señalización
- Acciones de emergencia, personal desprotegido, falta de primeros auxilios
- Personal no adiestrado
- Falta de limpieza y orden en el laboratorio

#### **¿PARA QUÉ PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD?**

- Proteger al laboratorista
- Proteger a la comunidad
- Proteger al medio ambiente

**PRÁCTICAS MICROBIOLÓGICAS ESTÁNDAR O PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD**

- Restringir o limitar el acceso cuando se está trabajando.
- Está completamente prohibido comer, beber o fumar en el laboratorio.
- No pipetear con la boca: usar pro pipetas o colocar algodón en las pipetas.
- Evitar salpicaduras y aerosoles.
- Descontaminar diariamente las superficies de trabajo o mesadas.
- Descontaminar el material de descarte.
- Descartar pipetas utilizadas con material infeccioso en recipientes con lavandina.
- Uso de guantes: quitarse los guantes para hablar por teléfono, abrir heladeras, canillas o puertas (sumergir manos enguantadas en NaOCl al 10%).
- Mantener un programa de control de insectos y roedores.

*El objetivo de la descontaminación es permitir el manejo sin riesgo de objetos o elementos de vidrio, metal, etc. que luego serán lavados y esterilizados. Es posible disminuir el riesgo de contaminación ambiental eliminando en la pileta los fluidos previamente descontaminados por autoclave o por el agregado de sustancias químicas. Cuando se trata de agentes de alta peligrosidad la descontaminación debería asegurar la muerte total de los mismos.*

**AGENTES DE RIESGO BIOLÓGICO**

Se clasifican en cuatro grupos de riesgo, en función de su peligro potencial:

- BSL 1 (BSL: *Biological Safe Level*). Agentes que no causan enfermedad humana.
- BSL 2. Agentes asociadas a enfermedad humana.
- BSL 3. Agentes exóticos con potencial de transmisión por aerosoles, causales de enfermedades serias o letales.
- BSL 4. Agentes exóticos peligrosos con alto riesgo de enfermedad letal, infecciones transmisibles por aire y por vías desconocidas.

**REQUERIMIENTOS GENERALES DEL LABORATORIO**

- Implementación de un nivel de bioseguridad.
- Prácticas y técnicas de laboratorio: estándar y especiales.
- Equipamiento de seguridad (barreras primarias).
- Diseño y construcción de las instalaciones (barreras secundarias).

**EQUIPAMIENTO DE SEGURIDAD**

Consiste en poseer:

- Gabinetes de bioseguridad apropiados
- Protección para el personal: guantes, guardapolvos, anteojos, barbijos, etc.
- Dispositivos para pipeteo
- Dispositivos de descontaminación del material de descarte: autoclaves

**GABINETES DE BIOSEGURIDAD**

Los hay de tres tipos:

**Clase I**

- El ingreso de aire protege al laboratorista.
- Salida de aire al exterior mediante filtros de HEPA.

**Clase II**

- Protección para el laboratorista, el producto y el medio ambiente.
- Área de trabajo “estéril”.
- Útil en el trabajo con microorganismos que se transmiten vía aerosol.
- Se emplea en cultivos de tejidos y virología.

**Clase III**

- Totalmente aislado, rodeado de un flujo de aire controlado.
- Se emplea para el trabajo con agentes de BSL 3 ó 4.

## ÁREAS BIOLIMPIAS

Un área biolimpia es aquella en la que por una serie de sistemas se lleva la probabilidad estadística de contaminación al mínimo. Los procedimientos que se utilizan son asépticos, en los cuales se trabaja con materiales previamente esterilizados por el método más adecuado para cada uno de ellos.

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. También en cirugía es importante una baja contaminación del área o sala de operaciones, para la prevención de infecciones.

Esto hizo que se diseñaran áreas que reducen la probabilidad de contaminación al mínimo.

Las áreas biolimpias pueden clasificarse en:

1. Áreas biolimpias convencionales
2. Áreas biolimpias de flujo laminar

**1. Áreas biolimpias convencionales:** las áreas biolimpias convencionales utilizadas, por ejemplo en la práctica de la medicina y la industria farmacéutica consisten en recintos cerrados, levemente presurizados, provistos de aire filtrado, donde por medios físicos (radiación UV, calor) o químicos se esterilizan superficies, elementos de trabajo y el aire ambiente.

En el local se introduce un gran caudal de aire acondicionado y filtrado por filtros absolutos a través de grillas difusoras localizadas en paredes, zonas de movimiento turbulento del aire y zonas donde permanece quieto.

Estas áreas tienen los siguientes inconvenientes:

- Al distribuirse el aire en forma turbulenta, las partículas son dispersadas en todas direcciones y se depositan sobre la superficie del área, debiéndose limpiar manualmente. La contaminación se reduce pero llega a niveles de 120.000 partículas por pie cúbico.
- La contaminación generada dentro del local no se puede eliminar, por lo que la contaminación aumentará con el tiempo, debiéndose interrumpir el trabajo para efectuar la limpieza.

Debido a que las áreas convencionales no aportan la suficiente seguridad ya que el máximo permitido era 100.000 partículas por pie cúbico, aparecieron las áreas de flujo laminar, que tuvieron luego su aplicación en medicina e industria farmacéutica.

### 2. Áreas biolimpias de flujo laminar

Corresponden a los gabinetes de seguridad de clases I, II y III. Emplean filtros HEPA (*High efficiency particulate air*)

Presentan las siguientes ventajas:

- Proveen aire limpio sin turbulencia
- Tienen capacidad autolimpiante
- Eliminan la contaminación cruzada (flujo vertical)
- Tienen menores costos de operación en cuanto a trabajos accesorios

## MEDIDAS EN CASOS DE ACCIDENTES

Se recomienda:

- Suspender inmediatamente la tarea que se estaba realizando.
- Avisar al inspector de bioseguridad.
- Determinar con qué se produjo el accidente y en qué condiciones.
- Iniciar si fuera necesario y posible un plan de inmunización pasiva-activa.

## CONDUCTA A SEGUIR EN EL CASO DE ACCIDENTES MÁS COMUNES

- Cortes, raspaduras, pinchazos: lavar con agua y jabón.
- Salpicaduras en los ojos: enjuagar inmediatamente con agua o solución fisiológica repetidamente sin cerrarlos.
- Aspiración o salpicaduras en la boca: enjuagar inmediatamente con agua.
- Manchas de sangre u otros materiales en la ropa: frotar con hipoclorito de sodio concentrado y luego agua.



## Desarrollo Práctico N° 1

### PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Todo material destinado a ser sometido a un proceso de esterilización debe estar PERFECTAMENTE LIMPIO previo a su acondicionamiento.

A. Si tuviéramos materiales y equipos contaminados con microorganismos, los pasos a seguir en su acondicionamiento para su esterilización, son:

1. Esterilización previa
2. Limpieza
3. Secado
4. Revisión
5. Armado y acondicionado
6. Rotulado
7. Esterilización del material
8. Conservación del material esterilizado

B. Si el material del que disponemos es material limpio y seco, saltaremos los pasos 1-4 y pasamos directamente al paso N° 5.

#### 1. ESTERILIZACIÓN PREVIA

- Tubos, placas de Petri, frascos, etc.: autoclave 1 atm. 30 minutos.
- Pipetas: autoclave 1 atm. 30 minutos o sumergir completamente durante un día en solución desinfectante (formalina, fenol, lisol, creolina, hipoclorito de sodio, etc. al 10%).

#### 2. LIMPIEZA

- Durante este proceso el personal deberá tomar las precauciones correspondientes utilizando métodos de barrera para su propia protección (guantes resistentes, camisolín impermeable y, si hay riesgo de salpicaduras en los ojos, protectores oculares).
- El lavado manual se realizará con un agente líquido neutro, tensioactivo, biodegradable (enzimático o no) y que no deje residuos. Se utilizarán temperaturas entre 40 - 50°C, preferentemente con el elemento sumergido. No utilizar productos que dañen o alteren la superficie de los materiales.
- Se llega al enjuagado, solo cuando se cuenta con la seguridad de haber removido toda la suciedad. Se debe enjuagar muy bien con agua corriente y potable. Si es necesario se utilizará agua destilada.

#### 3. SECADO

El secado manual se hará colocando el material en canastos de alambre, boca hacia abajo o sobre papel o paños de tela muy absorbente; a temperatura ambiente, o en estufa a 60 - 80°C.

#### 4. REVISIÓN

Habrá que realizarle una minuciosa inspección al material, una vez secado.

El material de vidrio que quede manchado será sumergido en solución sulfocrómica durante 24 horas; luego se hará el lavado y enjuagado correspondiente.

## 5. ARMADO Y ACONDICIONADO

**Tubos de ensayo, erlenmeyers, frascos:** aquellos que no poseen tapones aptos para someterlos a esterilización se les debe preparar una torunda de algodón. Deben ser confeccionadas de tal manera de ajustarse perfectamente al cuello del recipiente, que puedan extraerse sin esfuerzo, y cuidando que no queden flojas. El material así acondicionado se debe ubicar boca arriba en cestas de alambre o latas. Cubrir la parte superior del envase con papel, si es necesario atar con piolín. De esta manera se protege al algodón del humedecimiento por acción del vapor durante la esterilización o inmediatamente después, lo cual favorecería una posterior contaminación.

Si estos recipientes se deben esterilizar conteniendo soluciones acuosas, nunca deben llenarse totalmente; dejar una cámara de aire para evitar que se moje el tapón.

**Tubos de ensayo y frascos con tapa a rosca:** deben ser ligeramente desenroscados (para permitir el ingreso del vapor), ubicarlos igual que en el caso anterior en cestas y continuar los mismos pasos.

**Pipetas:** colocar un trozo de algodón en el extremo superior, de forma tal que no quede muy apretado ni tampoco flojo. Cortar tiras de papel y envolverlas en forma individual. Preparar paquetes de tamaño regular, con las pipetas de igual capacidad. Rotular señalando en cada caso volumen y una flecha que indicará la parte superior de la pipeta.

En caso de disponer de pipeteros, guardar las pipetas acondicionadas en forma individual dentro del cilindro. Colocar la tapa dejando los orificios abiertos.

**Placas de Petri:** envolver con papel en forma individual o en par.

**Agujas, jeringas:** envolver en papel o en tubos especiales. Las jeringas se deben acondicionar en forma separada ambas partes.

**Material plástico, goma:** proceder de la misma manera que los materiales descritos previamente, teniendo en cuenta la resistencia de los mismos a las temperaturas de esterilización. En caso de mangueras de goma, se deben humedecer previamente, enroscarlas de tal manera que no formen acodos para facilitar su esterilización.

**Sustancias pulverulentas y cristalizadas:** estas sustancias como talco, caolín, subnitrito de bismuto, y otras que toleren temperaturas de 160-165°C se esterilizan por calor no acuoso, en la estufa u horno de aire caliente. Se las acondiciona en frascos o potes de vidrio con tapa metálica que no contengan más de 30 g de la sustancia. Si es posible se las dispone en capas delgadas.

**Líquidos no acuosos:** tales como vaselina, aceites, glicerina y otros. Se los debe esterilizar exclusivamente por calor seco a 160-165°C. Se los acondiciona en pequeños volúmenes de no más de 30 g contenido en potes de vidrio con tapa metálica. En lo posible se los debe disponer en capas delgadas.

**Gasas vaselinadas:** se esterilizan exclusivamente por calor seco a 160°C; se las debe acondicionar en capas delgadas de no más de 13 a 15 mm de espesor, en cajas metálicas con tapa, se las sobreprotege con dos hojas de papel.

El armado y contenido de un paquete deberá responder a la necesidad, facilidad de su uso y permitir la libre circulación del agente esterilizante en todo su contenido.

## 6. ROTULADO

El rotulado de los materiales envasados puede ser manual o mecánico. El rotulado manual se hará con etiquetas, evitando escribir sobre el envoltorio para no dañar el mismo.

El material deberá estar identificado con los siguientes datos:

- nombre del material,
- fecha de elaboración, y/o
- validez del producto,
- código del responsable,
- número de lote.

## 7. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL

### 8. CONSERVACIÓN DEL MATERIAL ESTERILIZADO

Los pasos 7 y 8 se realizarán en los trabajos prácticos posteriores.

Cada alumno deberá preparar y acondicionar para ser esterilizado los siguientes materiales:

- material de vidrio (cajas de Petri, tubos de ensayos, pipetas, jeringas, etc.),
- material de plástico, goma,
- medios de cultivos,
- soluciones termoestables, erlenmeyer con agua destilada,
- líquidos no acuosos (frasco con vaselina, aceite, etc.),
- sustancias pulverulentas y cristalizadas (frasco con talco) etc.,
- hisopos.

La selección del método de esterilización se hará de acuerdo con el tipo de material.

**Material necesario:**

- Algodón
- Papel envolvente
- Hilo velero
- Marcador indeleble y/o bolígrafo
- Encendedor o fósforos
- Cinta adhesiva

**BIBLIOGRAFÍA**

- *III Reunión Nacional de Normas para el Control de Infecciones Hospitalarias*. Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación. Argentina. Diciembre, 1995.
- *Laboratory safety protocol*. CDC (Center for Disease Control). Atlanta Georgia. USA. April, 1983.
- *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. OMS (Organización Mundial de la Salud) Ginebra, 1983.
- *Seguridad en el laboratorio*. González, Jorge y cols. Centro nacional de Referencia de Hepatitis Virales. Dpto. de Virus. Div. Hepatitis. Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", 1984.
- *Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health care and public safety workers*. US Department of health and human service, Public health service. Center for disease control. Atlanta. Georgia. USA. February, 1989.
- *Culture of animal cells*. Ian Freshney R. Ed. US Department of health and human services, 1981.
- *Filtración de aire en la industria farmacoquímica, investigación y hospitales*. Ed. Mino Covo, 1995.
- *Manual de bioseguridad para técnicos de laboratorio*. Lucero N; Coto C. Acata Bioquímica Clínica Latinoamericana. Supl N°2, 1992.
- *Quality control methods for cells lines*. ATCC, 1985.



## Trabajo Práctico N° 2

### MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN (1º PARTE). ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

#### INTRODUCCIÓN

La esterilización es un término absoluto que implica la pérdida de viabilidad o la eliminación de todos los microorganismos contenidos en un objeto o sustancia, o su separación de acuerdo con el método empleado.

Se entiende por pérdida de viabilidad a la pérdida 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. Un ejemplo clásico lo constituyen las sustancias pirogénicas\*, que no son eliminadas de ciertos inyectables posterior a un proceso de esterilización habitual.

Eliminación se refiere a la separación de las estructuras microbianas presentes en un fluido, por ejemplo por filtración. Tampoco en este caso se eliminan los productos metabólicos que son filtrables.

#### DEFINICIONES

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), de acuerdo con la Disposición N° 6727/2003 y aprobado por Resolución Mercosur N° 28/2003, dispone en el presente Reglamento las siguientes definiciones.

**Desinfectante:** es un producto que mata todos los microorganismos patógenos pero no necesariamente todas las formas microbianas esporuladas en objetos y superficies inanimados (Res. GMC N° 26/96).

**Sanitizante:** es el agente/producto que reduce el número de bacterias a niveles seguros de acuerdo con normas de salud (Res. GMC N° 26/96).

**Desodorizante:** producto que tiene en su composición sustancias con actividad antimicrobiana, capaz de controlar olores desagradables (Res. GMC N° 26/96).

**Esterilizante:** es un producto usado con la finalidad de destruir todas las formas de vida microbiana, incluyendo las esporas bacterianas (Res. GMC N° 26/96).

**Fungicida:** es un producto letal para todas las formas de hongos (Res. GMC N° 26/96).

**Germicida:** es un producto de acción letal sobre los microorganismos, especialmente los patógenos (gérmenes) (Res. GMC N° 26/96).

**Sufijo “cida”:** indica que la acción antimicrobiana es la muerte de los microorganismos a los que se refiere, por ejemplo: germicida, microbicida, bactericida, fungicida, etc.

**Sufijo “stático” / prefijo “anti”:** indica que la acción antimicrobiana se limita a la inhibición del crecimiento (multiplicación) del microorganismo sin llegar necesariamente a producirse la muerte del mismo, ejemplos: bacteriostático, fungistático, etc.

**Esporicida:** producto letal para las formas esporuladas de bacterias.

Es importante tener claro el concepto de esterilización.

**Antiséptico:** agente que controla y reduce la presencia de microorganismos potencialmente patógenos sobre piel y/o mucosas (solo pueden aplicarse externamente sobre seres vivos).

#### MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

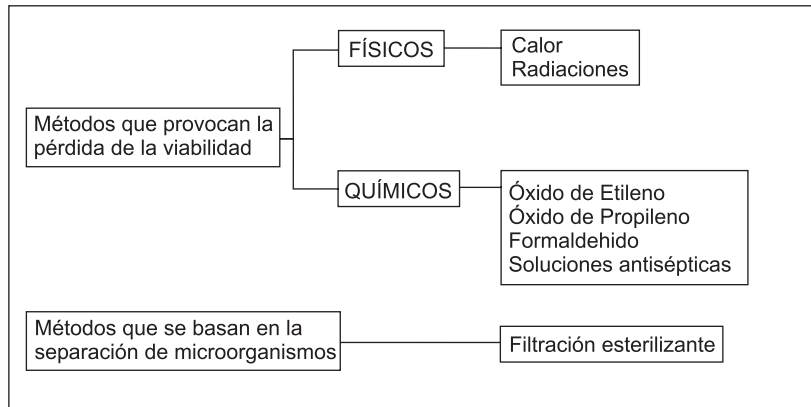
Para lograr la esterilización de un material determinado, se cuenta con varios métodos cuya elección depende de:

*\*Pirogénicas son sustancias por lo general no proteicas, que introducidas al torrente sanguíneo provocan un cuadro febril.*

- 1- Sensibilidad del material al agente esterilizante
- 2- Penetrabilidad del agente en el material a esterilizar
- 3- Presentación del material (volumen total o fraccionado)
- 4- 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 permanecen asociados al objeto o sustancia ahora estéril.

**MÉTODOS HABITUALES DE ESTERILIZACIÓN**



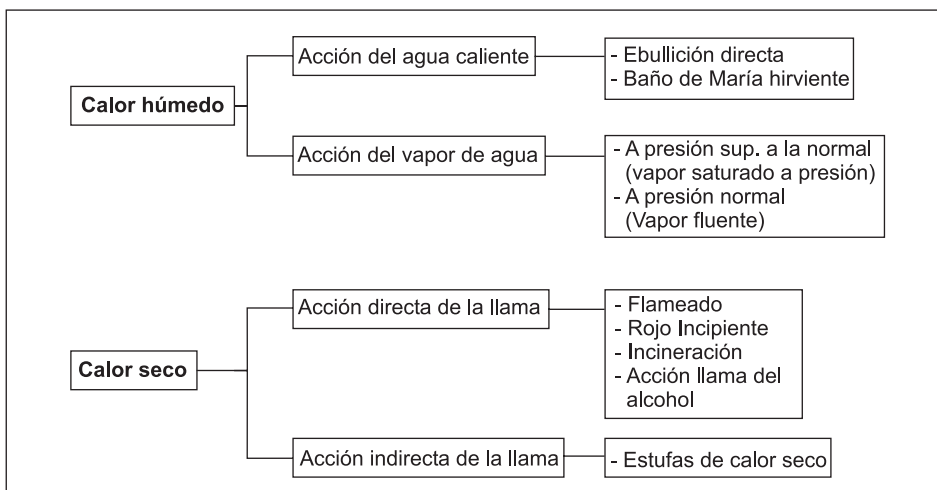
**MÉTODOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD**

**CALOR**

Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. La mayoría de los hongos 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.

El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos. Cada uno de estos procesos incide en distinto grado sobre la pérdida de viabilidad, según el método empleado. Los métodos que se basan en la aplicación del calor como agente esterilizante son preferidos y aplicables a la mayoría de los materiales.

La utilización de este método y su eficacia depende de dos factores: tiempo de exposición, temperatura. Abarcan el empleo de: calor húmedo y calor seco.



*Es imprescindible tener claro el concepto de que, métodos incluidos en el Cuadro como ebullición directa, baño de María hirviente y acción del calor de agua a presión normal 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.*

## ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

### ACCIÓN DEL VAPOR DE AGUA

**Agente esterilizante:** vapor de agua saturado a presión superior a la normal.

**Mecanismo de acción:** el principal mecanismo responsable de la muerte microbiana es la coagulación de proteínas como consecuencia de una liberación de energía (de 540 cal/g), por acción del vapor de agua saturado.

**Precauciones:** el vapor de agua es un agente esterilizante de superficie, de modo que establece su acción sólo sobre esta. Por lo que las mismas se deberán exponer libres a la acción del agente esterilizante permitiendo su pasaje, ej: pinzas abiertas, jeringas desensambladas, etc.

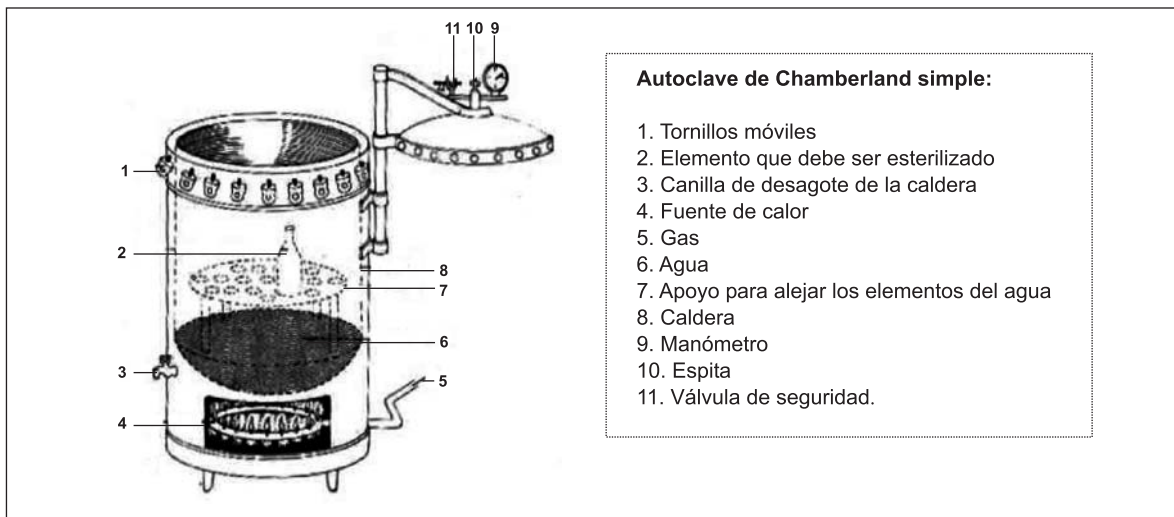
Los materiales húmedos conducen el calor mucho más rápido que los materiales secos por la energía liberada durante la condensación.

Para lograr una esterilización confiable, el método estándar es el vapor saturado en autoclave, a temperatura de 121°C durante no menos de 15 minutos. Esta temperatura se logra por vapor de agua a una atmósfera de presión sobre la atmosférica. Sirve para destruir organismos formadores de esporas.

El autoclave es el aparato más comúnmente utilizado en los laboratorios para esterilizar cultivos y soluciones que no formen emulsiones con el agua y que no se desnaturalicen a temperaturas mayores a 100°C (aceites, vaselina). También se usa para esterilizar material textil (siempre que el autoclave esté provisto de un sistema de secado por vacío); elementos tubulares conviene humedecerlos con agua destilada, para que el vapor generado expulse el aire. El material de vidrio puede ser esterilizado en autoclave, pero luego debe ser secado en estufa.

El autoclave de Chamberland consta de: una caldera de cobre sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas, ésta se cierra por la parte superior con una tapa de bronce. Esta tapa posee tres 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 como contrapeso o a resorte.

En el uso del autoclave es muy importante, permitir que el vapor fluyente desplace en forma total 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, la temperatura resultante será tanto menor cuanto mayor proporción de aire contenga la cámara.



**INFLUENCIA DE LA DESCARGA INCOMPLETA DE AIRE EN LA TEMPERATURA DEL AUTOCLAVE**

Presión (atm.)	Temperatura (°C)			
	Descarga completa del aire	Descarga de 2/3 del aire	Descarga de 1/2 del aire	Sin descarga del aire
1/3	109	100	90	72
2/3	115	109	100	90
<b>1</b>	<b>121</b>	<b>115</b>	<b>109</b>	<b>100</b>
4/3	126	121	115	109
5/3	130	126	121	115
<b>2</b>	136	130	126	121

**CONDICIONES DEL PROCESO**

Las condiciones a tener en cuenta son: temperatura y tiempo.

Temperatura (°C)	Tiempo de exposición mínimo (minutos)
121	20
126	10
134	7

**VENTAJAS DEL CALOR HÚMEDO**

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- Bajo deterioro del material expuesto (por < temperatura y < tiempo)
- No deja residuos tóxicos
- Económico

**DESVENTAJAS**

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua (grasas, polvos)
- No apto para aplicar en materiales termolábiles
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

**MATERIALES QUE SE PUEDEN Y NO SE PUEDEN ESTERILIZAR CON VAPOR**

Materiales esterilizables con vapor	Materiales no esterilizables con vapor
Material textil	Sustancias oleosas
Material de vidrio	Sustancias grasas
Material de goma	Polvos
Instrumental quirúrgico de acero inoxidable	Instrumental quirúrgico cromado o niquelado
Soluciones acuosas	Artículos eléctricos sin cobertura especial

**VAPOR FLUENTE**

Consiste en someter el material a la acción del vapor fluente 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.

**TYNDALIZACIÓN**

Esta técnica se emplea cuando se desea esterilizar sustancias que se descomponen o se alteran a ciertas temperaturas, como el caso de sueros sanguíneos, soluciones albuminosas, azucaradas, etc.

Se coloca el material en recipientes adecuados, se calienta a baño de María a una temperatura que varía entre 55 y 100°C, durante una hora. Se deja enfriar y se mantiene a la temperatura ambiente, durante 24 horas, repitiendo el calentamiento al cabo de este lapso de tiempo y a través de las 48 horas.

Calentando a menor temperatura se hace necesario aumentar el número de calentamientos.



Durante el primer calentamiento se destruyen las formas vegetativas, quedando con vida los esporos, que se desarrollan luego. Las formas vegetativas por ello producidos son las que se destruyen en los posteriores calentamientos.

### **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.

Consiste en mantener la leche o los alimentos en recipientes a 63°C, 30 minutos e inmediatamente refrigerarlos.

La pasteurización elimina todos los gérmenes patógenos, no esporulados, deja microorganismos sobrevivientes que producirán alteración del producto pasteurizado (ej. leche) si no se la refrigera adecuadamente.

Este método no “esteriliza”, sí reduce la carga microbiana no afectando las propiedades del material.

### **CONTROL DE ESTERILIZACIÓN**

Es el que se realiza para comprobar si se cumplieron las condiciones del método empleado.

Existen diversos medios de control de esterilización:

**Sustancias que funden a temperaturas de esterilización:** vienen envasadas en ampollas que, al alcanzar temperatura de 160°C funden y son teñidas de un color muy vivo, a causa de que la sustancia del interior de la ampolla está acompañada de un colorante sólido, responsable, de tal tinción.

**Cintas de papel o cartón:** procesadas con sustancias químicas que, al llegar a determinadas temperaturas, cambian de color. Se usan generalmente en la esterilización en autoclave, ya que, al ser expuestas al vapor saturado en un tiempo precisado, viran de color o aparecen en ella inscripciones con la palabra “esterilizado”.

**Tirillas impregnadas o ampollas con microorganismos muy resistentes al calor:** una tirilla con *Bacillus stearothermophilus* se introduce junto con la carga a esterilizar. Finalizado el proceso se analiza para verificar su eficacia. Para el caso de control de esterilización de estufas (aire seco), por lo general son usados los esporos de *Bacillus subtilis* var niger.

El indicador debe procesarse de acuerdo con las recomendaciones de su fabricante.

### **CONTROL DE ESTERILIDAD**

Se realiza sobre muestras o alícuotas del material esterilizado, con el objeto de comprobar la total ausencia de microorganismos en el mismo.

Permite comprobar en forma probabilística si el material quedó completamente esterilizado, puede ser que sea un porcentaje representativo de todo el material.

**Transferencia directa a medio de cultivo:** se transfiere una parte de muestra a medios de cultivos apropiados que permitan el crecimiento de cualquier contaminante.

Tioglicolato para anaerobios y aerobios 37°C.

Tripticasa-soja para aerobios 25°C.

**Filtración por membrana:** se utiliza para determinar la esterilidad de medios de cultivo, soluciones de antibiótico, etc.

Se filtran los medios y se procesa el filtro como un control de esterilidad para determinar si hay microorganismos presentes.

## Desarrollo Práctico N° 2. (1° parte)

### ESTERILIZACION POR CALOR HÚMEDO

Cada alumno preparará y esterilizará por calor húmedo en autoclave a presión el siguiente material: vidrio, plástico, goma, medios de cultivos, soluciones termoestables.

#### PROCESO DE ESTERILIZACIÓN POR AUTOCLAVE

- 1- Verificar el estado general del equipo y limpieza interior.
- 2- Verificar el nivel del agua del autoclave, asegurando que el mismo se encuentre a la altura de la tapa de la base. Si fuera necesario, reponer el agua con agua destilada (no sobrepasar los orificios de la bandeja).
- 3- Verificar que la junta de la tapa esté en buenas condiciones, sin roturas ni grietas. Ante la posibilidad de un mal cierre de la misma, proceder a su reemplazo.
- 4- Colocar la carga a esterilizar o descontaminar dentro del autoclave (sobre la tapa de la base) en forma ordenada y en recipientes, de forma tal que ningún objeto quede suelto dentro de la misma y dejando un espacio no menor de 5 cm, entre dichos elementos y el borde superior del autoclave.
- 5- Colocar en el interior de la carga un control térmico de esterilización (químico y/o biológico). Ubicar los controles en aquellos lugares donde considere más difícil el acceso al vapor.
- 6- Cerrar la tapa superior del autoclave y ajustar las mancuernas con las manos de a pares enfrentados. Nota: no ajustar las mancuernas del autoclave empleando objetos como, palos, caños, etc. La tapa está diseñada para ser cerrada con la fuerza de las manos.
- 7- Verificar que la espita esté abierta. En caso contrario abrirla.
- 8- Abrir la llave de paso del gas y encender el mechero.
- 9- Regular la entrada de aire para que la llama del mechero sea máxima controlando que la totalidad del mismo esté encendida.
- 10- Colocar la manguera proveniente de la espita en una lata con agua fría.
- 11- 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 golpe seco del vapor que reemplazó a aquel.
- 12- Comprobada la total eliminación del aire interior, cerrar la espita suavemente.
- 13- Una vez alcanzada la presión de trabajo (1,0 atm. 121°C), regular la llave de gas de manera tal que la presión se mantenga en dicho valor.
- 14- Mantener la temperatura y presión constantes durante 15 minutos si se trata de medios de cultivo, y 30 minutos si se trata de material de vidrio o descontaminación. Verificar constantemente que se mantengan dichas condiciones.
- 15- Transcurrido el tiempo indicado en 14, proceder a cerrar la llave de gas.
- 16- Una vez que la presión haya alcanzado el valor 0 atm., proceder a abrir la espita permitiendo que se igualen las presiones interior y exterior.
- 17- Colocarse los guantes de amianto.
- 18- Liberar las mancuernas y proceder a abrir la tapa del autoclave, cuidando de alejar el rostro de la boca del autoclave.
- 19- Verificar que se disponga de lugar para descargar el contenido del autoclave.
- 20- Retirar los elementos del interior del autoclave.
- 21- Verificar el control de esterilización. En caso contrario debe repetirse la operación si la carga lo permitiera. En caso de repetirse la operación de esterilización, esta deberá ser registrada.

22- Si se hubieran derramado elementos en el interior del autoclave, proceder a su vaciado y limpieza utilizando agua, detergente y esponja.

23- Recordar, si se vuelve a esterilizar inmediatamente, reponer el agua fría en el fondo, caso contrario se limpia y seca perfectamente.

24- Colocar la tapa de manera tal que cubra la boca del autoclave.

#### ¡PRECAUCIONES!

**Nunca** purgar de más, porque variará el volumen de los medios, soluciones, etc. Recordar que el agua está hirviendo.

**Nunca** cerrar la espita fuerte. 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.

**Nunca** abrir el autoclave si la presión manométrica no está en cero. Recordar que la presión que indica el manómetro está por encima de la normal. Es decir, autoclavar a 1 atm. significa 1 atm. por encima de la presión atmosférica normal (760 mm Hg).

#### BIBLIOGRAFÍA

[http://www.anmat.gov.ar/Normativa/Normativa/Domisaneitarios/Disposicion\\_ANMAT\\_6727-2003.pdf](http://www.anmat.gov.ar/Normativa/Normativa/Domisaneitarios/Disposicion_ANMAT_6727-2003.pdf)

-*Microbiología*. Zinsser y col. Ed. Med. Panamericana. Ed.17, 1985

-*Biología de los microorganismos*. Brock y col. Ed. Omega, Ed.1990.

-*Diagnóstico Microbiológico*. Bailey y Scott. Ed. Med. Panam., 7a Ed. 1989.

-*Manual de esterilización*. Bidou y Grupillo. Ed. 1983.

-*Manual de esterilización Moderna*. Pintos, J. C. Ed. Zanetti, 1970.

-[www.microbiologia.com.ar](http://www.microbiologia.com.ar)-[www.google.com](http://www.google.com)

-*Apuntes Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)*, 2000.



## Trabajo Práctico N° 2

### MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN (2º PARTE) ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

#### INTRODUCCIÓN

El calor seco produce procesos oxidativos y fusión de membranas por sobre la desnaturalización proteica. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con estos. La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad del agua del medio es baja.

#### POR ACCIÓN DIRECTA DE LA LLAMA

**Flameado:** se aprovecha la llama de un mechero de Bunsen. Se usa para varillas y planchas de vidrio, espátulas, bocas de recipientes de vidrio, etc. Más que un método real de esterilización, reduce la probabilidad 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 ansas de platino, lancetas, agujas de disección, etc.

**Acción de la 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, materiales de vidrio, cirugía, etc.

**Incineración:** se utiliza para material de descarte.

#### POR ACCIÓN DEL SOBRECALENTAMIENTO DEL AIRE

**Agente esterilizante:** aire caliente.

**Mecanismo de acción:** la muerte del microorganismo se produce como consecuencia de la liberación de energía, siendo uno de los mecanismos la oxidación degradativa.

**Precauciones:** dado que el aire es un mal conductor del calor, es necesario extremar los cuidados en la preparación del material. El mismo debe estar limpio, libre de materia orgánica, grasa o aceites que aíslan los microorganismos.

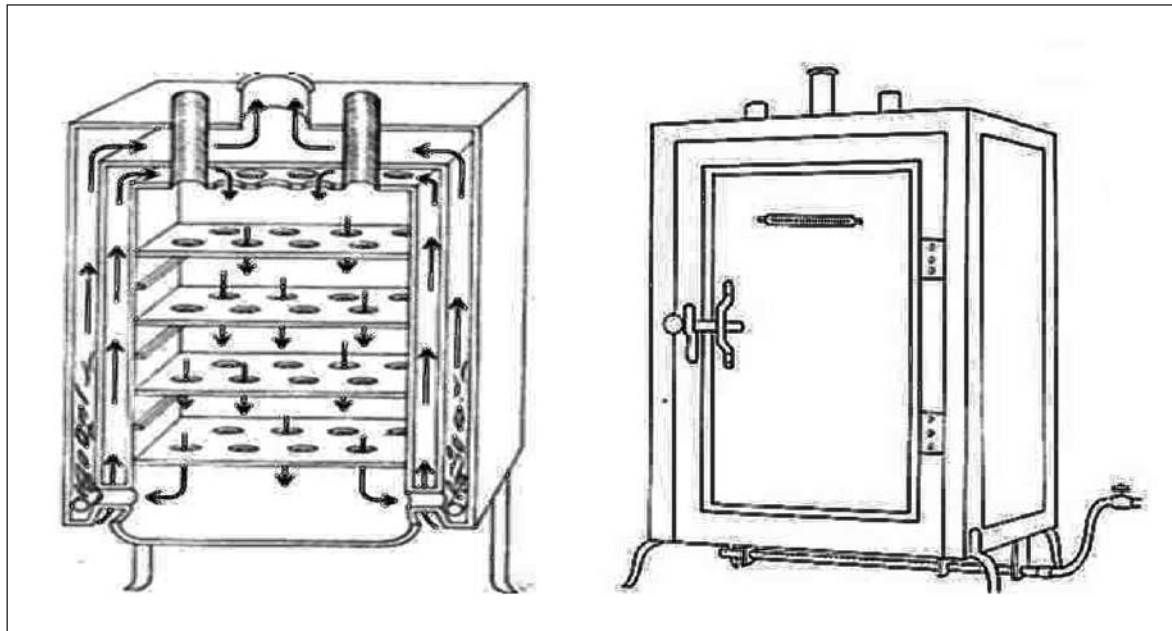
**Parámetros para tener en cuenta:** estos parámetros variarán de acuerdo con la carga, volumen, peso, resistencia térmica del material, tipo y potencia de la estufa.

- **Temperatura.** Las temperaturas de esterilización fluctúan entre 160°C a 180°C. La temperatura empleada no deberá estar por debajo de los 160°C durante una hora, pues es la mínima condición, cuando el tenor de agua es de 0%. Tampoco deberán usarse temperaturas superiores a las establecidas, (por encima de 180 °C), ya que el material sufriría serios deterioros.

- **Tiempo.** Para definir los tiempos de todo el ciclo se considera:

1. El tiempo que necesita el aire dentro de la cámara para alcanzar la temperatura de esterilización (tiempo de precalentamiento).
2. El tiempo que tardan los materiales en alcanzar la temperatura de esterilización.
3. El tiempo de esterilización propiamente dicho.

- **Equipos.** Estufas eléctricas u hornos son utilizados para este fin. El agente esterilizante es el aire caliente seco. Este proceso de esterilización requiere mayor temperatura y tiempo que en el caso del vapor saturado, ya que tiene una menor capacidad para tomar, transportar y ceder calor. El calor penetra a través de cualquier “materia” sea cual fuese ella, atravesándola, y se dirige desde los puntos de mayor temperatura a los de menor temperatura hasta igualarse la misma en todos los puntos.



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.

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

*Bajo ningún concepto debe abrirse la puerta de la estufa durante el proceso de esterilización, pues se producen disminuciones de temperaturas de hasta 25°C en el interior de la cámara y de hasta 40 °C en el interior de las cajas. Esto afecta el correcto proceso de esterilización.*

#### MATERIALES QUE PUEDEN Y NO SE PUEDEN ESTERILIZAR POR CALOR SECO

Materiales que pueden esterilizarse	Materiales que no pueden esterilizarse
Instrumental cromado	Material textil
Objetos de vidrio, aluminio, porcelana	Materiales sintéticos y gomas
Compuestos minerales termoestables en forma de polvos (talco, bórax, etc.)	Instrumental óptico, eléctrico
Vaselina, parafina, sustancias grasas, aceites	Materiales sensibles a altas temperaturas

Respecto a las sustancias grasas y pulverulentas es importante señalar que las mismas deben acondicionarse en volúmenes pequeños, para asegurar que el calor penetre en toda la masa del material a esterilizar ya que son malos conductores térmicos.

#### Ventajas

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo, viscosas, no acuosas. (No volátiles).

#### Desventajas

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

#### RADIACIONES

Su acción depende de:

1. Tipo de radiación
2. Tiempo de exposición
3. Dosis

**Radiaciones ionizantes:** producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos. Las más utilizadas son los rayos gamma por su gran penetrabilidad, y se emplean para esterilizar materiales termolábiles como jeringas descartables, sondas, agujas, prótesis, catéteres, etc. Se utilizan a escala industrial (antibióticos, vacunas, alimentos, etc.), ya que se requiere de instalaciones complejas y costosas. No son utilizadas para medios de cultivos o soluciones proteicas porque se producen alteraciones en sus componentes.

**Rayos ultravioleta:** afectan a las moléculas de ADN de los microorganismos. Con longitudes de onda entre 240 a 280 nm (nanómetros), afectan principalmente los ácidos nucleicos de los microorganismos, dado que las uniones covalentes entre residuos adyacentes de pirimidinas forman dímeros, los que llevan a la pérdida de viabilidad. Estos distorsionan la forma del ADN e interfieren en el apareamiento normal de las bases, da como resultado inhibición de la síntesis de ADN y por lo tanto el crecimiento y la respiración.

La radiación ultravioleta puede producirse artificialmente con lámparas de vapor de mercurio.

Son escasamente penetrantes y se utilizan en el control de infecciones llevadas por el aire, por ejemplo, esterilización de quirófanos, de superficie, etc.

### AGENTES QUÍMICOS

Generalmente se utilizan agentes alquilantes. Estos reemplazan a los átomos de hidrógeno lábiles de los grupos amino, hidroxilos, formando uniones de alta energía que llevan a la pérdida de las actividades biológicas de las moléculas con las que se combinan y provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos. Son activos tanto para esporos como para células vegetativas.

VARIABLES DE ESTERILIZACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS:

1. Concentración del agente
2. Temperatura del proceso
3. Tiempo de exposición
4. Humedad
5. Presión

### ÓXIDO DE ETILENO

**Agente esterilizante:** es un gas sumamente explosivo cuando se mezcla con el aire. Es una sustancia altamente reactiva; con agua forma etilenglicol.

**Mecanismo de acción:** actúa por alquilación de las proteínas constituyentes de las membranas microbianas.

**Efectos adversos:** produce irritación de mucosas, manifestaciones gastrointestinales (náuseas, vómitos); otras más severas: disnea, cianosis, migrañas, somnolencia, prurito, hemólisis, aberraciones cromosómicas, teratogenicidad y carcinogenicidad.

Debido a estos efectos adversos, se lo considera como una sustancia altamente peligrosa y de uso restringido a profesionales debidamente capacitados y en instituciones habilitadas.

Este método se utilizará sólo cuando no se pueda aplicar el calor y además los materiales lo permitan.

**Equipos.** Se recomienda el esterilizador por óxido de etileno, que permita la realización de un ciclo completo (esterilización/desgasificación) dentro de una misma cámara. El equipo debe tener:

- Un panel de control para medir presión, temperatura y tiempo del proceso.
- Estará equipado con sistemas de ventilación y desgasificación de los materiales.
- El funcionamiento será a presión negativa, para seguridad global del personal.
- Deberá estar equipado con un dispositivo de calentamiento y humidificación, como así también con un sistema de seguridad en su cierre.

**MATERIALES QUE PUEDEN Y NO SE PUEDEN ESTERILIZAR POR ÓXIDO DE ETILENO**

Materiales que pueden esterilizarse	Materiales que no pueden esterilizarse
Instrumental óptico y de microcirugía, implantes.	Todos aquellos que pueden ser procesados por el calor húmedo o seco.
Prótesis, marcapasos, respiradores, reanimadores.	
Materiales termosensibles que no se alteren por la esterilización con óxido de etileno y no admitan otro procedimiento.	Los materiales de PVC esterilizados por radiación gamma no deben ser sometidos a esterilización por óxido de etileno.

**Nivel máximo ambiental**

1 ppm  
para jornada de ocho horas de trabajo.

**Nivel máximo permitido para materiales**

5 ppm. Según decreto 255-Ministerio de Salud Pública y Acción Social.

**Protección del personal**

El personal destacado en esta área debe estar perfectamente instruido y se le deberá realizar controles médicos cada 180 días con estudios específicos al respecto. No trabajar en el área de conocer su condición de embarazo.

**SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN**

MATERIALES	CALOR HÚMEDO	CALOR SECO	EtO
Material textil (gasas, ropas, vendas, etc.)	R	No	N
Material plástico	R - 1 - 8	No	O - 3
Material de goma	R	N	O - 3
Instrumental de acero inoxidable	R	O - 2 - 3	O - 3 - 4
Instrumental cromado y niquelado	N	R	O - 5
Material de vidrio	R	R	O - 6
Talco	N	R	N
Vaselina/ Aceites	N	R	N
Instrumental óptico	R - 8	N	O - 8
Prótesis /marcapaso / implantes	R - 8	N	O - 8
Contenidos acuosos	R	N	N
Cepillos para cirugía	R	N	O - 9

- R = Recomendado
  - 1: solo si resiste la temperatura del calor húmedo
  - 2: solo cuando no se dispone de autoclave a vapor
  - 3: solo cuando se deteriora con la acción del calor húmedo
- O = Optativo
  - 4: solo para instrumental muy delicado de microcirugía
  - 5: solo cuando no se dispone de estufas
- N = No recomendado
  - 6: solo cuando este tipo de materiales pertenece a un conjunto que debe esterilizarse con EtO
  - 7: solo en casos de urgencia y bajo normas
  - 8: solo cuando lo recomienda el fabricante
  - 9: solo cuando contienen plástico o son de este material

**Aldehídos:** son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad enzimática. Estos compuestos destruyen las 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.

**Formaldehído:** se utilizan las pastillas de formaldehído, las que 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 horas.

**Esterilización por gas-plasma de peróxido de hidrógeno:** es un proceso de esterilización a baja temperatura, la que consta en la transmisión de peróxido de hidrógeno en fase plasma (estado entre líquido y gas), que ejerce la acción biocida.

Ventajas	Desventajas
No deja residuo tóxico	No se pueden esterilizar objetos que contengan celulosa, algodón, líquidos, humedad, madera o instrumental con lúmenes largos y estrechos.
Se convierte en agua y oxígeno al final del proceso	
El material no precisa aireación	
El ciclo de esterilización dura entre 54 y 75 min.	Es el método de esterilización más caro de los descritos.

La validez de la esterilización está condicionada a los eventos a los que el material está expuesto, y se considerará el tipo de envoltorio y el lugar donde se almacenan los materiales esterilizados.

**MÉTODOS QUE SE BASAN EN LA SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS**

**Filtración:** se usan membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado.

La filtración se utiliza para esterilizar: emulsiones oleosas, algunos tipos de pomadas, soluciones termolábiles, oftálmicas, intravenosas, antibióticas, vitaminas, drogas diagnósticas, radiofármacos, medios para cultivos celulares.

El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas que están en el límite de separación según el tamaño del poro de la membrana que se utilice. Las partículas mayores van a ser retenidas en la superficie, y las menores 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.

El tamaño del poro va a depender del uso a que vamos a someter el sistema. Ejemplo:

Diámetro del poro	Usos
0,1 – 0,2 µm	Filtración esterilizante
0,45 µm	Análisis de coliformes en agua
5 µm	Análisis de células en fluidos corporales

**Capacidad del sistema:** el tamaño de la membrana estará 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.

Existen tres tipos básicos de filtros:

- **Filtros profundos o de profundidad:** consisten en un material fibroso o granular prensado, plegado, activado o pegado dentro de los canales de flujo. En este tipo de filtro la retención de las partículas se produce por una combinación de absorción y de retención mecánica en la matriz.

- **Membranas filtrantes:** tienen una estructura continua, y la retención se debe principalmente al tamaño de la partícula. Partículas más pequeñas al tamaño del poro quedan retenidas en la matriz del filtro debido a efectos electrostáticos.

El tamaño de los poros de los filtros de membrana, compuestos por ésteres de celulosa biológicamente inerte, varía entre 14 m a 0,023 m. El filtro de 0,22 m es el más usado por ser menor que el tamaño de las bacterias. Siempre debe utilizarse con soluciones en las cuales pueden estar presentes especies de *Pseudomona* u otras bacterias pequeñas. En la filtración de líquidos, un gran número de partículas algo menores que el tamaño de los poros es retenido por las fuerzas de van der Waals, por atrapamiento al azar en los poros y por suma de partículas retenidas previamente.

- **Filtros de huella de nucleación (nucleoporo):** son películas muy delgadas de policarbonato que son perforadas por un tratamiento conjunto con radiación y sustancias químicas. Son filtros con orificios muy regulares que atraviesan la membrana verticalmente. Funcionan como tamices, evitando el paso de toda partícula con tamaño mayor del poro.

## Desarrollo Práctico N° 2 (2º parte)

### ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

Cada alumno preparará y esterilizará por calor seco en estufa:

- material de vidrio: cajas de Petri, pipetas, jeringas de vidrio (armadas),
- material metálico cerrado;
- polvos, talcos, vaselina, aceites (conviene distribuirlos previamente en pequeñas proporciones), plástico, goma, medios de cultivos, soluciones termoestables.

#### **NORMAS DE USO GENERAL**

- Cargar la estufa de esterilización a temperatura ambiente
- Disponer los materiales acondicionados en forma tal que:
  - no impida la convección de aire;
  - no toque las paredes.
- Ubicar controles de esterilización en aquellos lugares donde se considere de difícil acceso el calor.
- Controlar la posición del termómetro (el bulbo no debe tocar la carcasa metálica ni puerta) pues se podrían registrar temperaturas falsas mayores a las reales.
- Poner en funcionamiento.
- Cuando alcanza la temperatura deseada, comenzar a contar el tiempo de esterilización.
- Terminado el tiempo de esterilización, dejar enfriar antes de retirar el material.

#### **FILTROS**

El instructor indicará sobre la preparación, acondicionamiento, esterilización, empleo y uso de los distintos tipos de filtros.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Microbiología*. Zinsser y col. Ed. Med. Panamericana. Ed. 17, 1985.
- Biología de los microorganismos*. Brock y col. Ed. Omega, 1990.
- Diagnóstico Microbiológico*. Bailey y Scott. Ed. Med. Panam., 7a. Ed., 1989.
- Manual de esterilización*. Bidou y Grupillo. Ed. 1983.
- Manual de esterilización Moderna*. Pintos, J. C. Ed. Zanetti, 1970.



## Trabajo Práctico N° 3

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS. EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras que se reciben en un laboratorio de microbiología para su análisis pueden ser diversas. A veces consisten en muestras de alimentos, materiales clínicos, líquidos de diversos orígenes, etc. El responsable del laboratorio deberá considerar su naturaleza y posible contenido del espécimen, y conocer las dificultades para el cultivo y la tinción de ciertos microorganismos.

#### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La correcta recolección de una muestra para su estudio microbiológico es, posiblemente, la etapa más importante para lograr el aislamiento de microorganismos responsables de contaminaciones y/o infecciones. Para ello se debe tener en cuenta:

- 1- Elegir el material que refleje con mayor posibilidad el proceso de contaminación/ infección.
- 2- Establecer períodos óptimos para la recolección de muestras, a fin de tener la mejor oportunidad de aislar los microorganismos causales.
- 3- Obtener suficiente volumen de muestra para llevar a cabo las distintas técnicas de estudio.
- 4- Utilizar dispositivos de recolección, recipientes para las muestras y medios de cultivo adecuados para asegurar el óptimo aislamiento de microorganismos.
- 5- Siempre que sea posible, obtener las muestras antes de administrar/agregar antimicrobianos.
- 6- El envase recolector de la muestra debe ser estéril.
- 7- Utilizar medios de transporte adecuados, en caso necesario.
- 8- Remitir a la brevedad la muestra al laboratorio para su estudio microbiológico.

#### EXAMEN DIRECTO DE LA MUESTRA

##### • Examen macroscópico

El examen macroscópico de la muestra ofrece inmediata información, imposible de lograr de ningún otro modo. Si hay evidencia que la muestra ha sido recogida incorrectamente, si hay cantidad insuficiente de material, si el recipiente es inadecuado, o si hubo excesiva demora en el envío, se debe solicitar una segunda toma de muestra. El examen macroscópico puede proveer características valiosas en cuanto a la naturaleza y calidad de la muestra recogida.

Los caracteres macroscópicos a observar comprenden: olor, color, aspecto, presencia de gas, gránulos, etc.

##### • Examen microscópico

La importancia del examen microscópico de las muestras, no solo puede convalidar la calidad de las mismas, sino que la observación de distintos tipos de células, bacterias, micelios, levaduras, estructuras parasitarias, cristales, polvos, granos de almidón, glóbulos de grasas, etc., pueden proveer información suficiente para formular un diagnóstico presuntivo.

El examen microscópico directo puede también proporcionar evidencia sobre la presencia de especies bacterianas anaerobias.

Para examinar al microscopio los aislados microbianos o los microorganismos de ciertos materiales clínicos existen dos maneras: en estado vivo y por fijación.

**EXAMEN EN FRESCO. EN ESTADO VIVO**

Muchas veces es necesario examinar algunos microorganismos en estado vivo, porque no se los puede colorear convenientemente ni se los puede cultivar con facilidad. También, al examinarlos in vivo, no se altera su morfología y es posible observar su movilidad y otras características.

Las muestras pueden ser extendidas directamente sobre la superficie de un portaobjetos o, si el material es espeso, puede diluirse con solución fisiológica estéril para facilitar la diferenciación de los distintos elementos. Se coloca un cubre objetos sobre la superficie del material, y se seca con papel absorbente el exceso de líquido que escapa por los bordes. Este tipo de preparación se conoce como montaje directo o montaje en fresco. Para observaciones posteriores se lo puede conservar, sellando los bordes con esmalte para uñas o mezcla parafina-vaselina (Vaspar).

Este tipo de preparaciones y otras con algunas modificaciones se observan con microscopio de campo claro o de contraste de fase.

Las preparaciones húmedas con frecuencia se emplean para detectar: huevos, quistes, trofozoítos móviles de parásitos, células de distintos tipos, elementos fúngicos, etc.

En el Cuadro N° 1 se detallan distintas técnicas que se utilizan para el examen directo de muestras sin teñir.

**CUADRO N°1. TÉCNICAS DE EXAMEN DIRECTO DE MUESTRAS SIN TEÑIR**

Métodos y materiales	Propósito	Técnicas
<p><i>Montaje en solución salina</i></p> <p>Cl Na acuoso 0,85%</p> <p>Portaobjeto</p> <p>Cubreobjeto</p> <p>Esmalte de uña o Vaspar</p>	<p>Determinar actividad biológica de microorganismos, incluyendo movilidad. Huevos, quistes, larvas, trofozoítos móviles de parásitos. Elementos fúngicos.</p>	<p>Sobre un portaobjeto suspender en una gota de solución fisiológica una pequeña cantidad de muestra.</p> <p>Colocar un cubreobjeto y examinar al microscopio con objetivo de 10x y 40 x. Bajando el condensador para reducir la cantidad de luz transmitida.</p> <p>Sellar el cubreobjeto con esmalte de uña.</p>
<p><i>Montaje en iodo</i></p> <p>- Solución de Lugol (Iodo 5 g, KI 10 g, agua dest 100 ml. Disolver el KI y añadir el iodo hasta disolución. Filtrar y conservar en frasco c/tapa hermética. Diluir 1:5 con agua antes de usar)</p> <p>- Portaobjeto</p> <p>- Cubreobjeto</p> <p>- Esmalte de uña / Vaspar</p>	<p>Se emplea habitualmente en paralelo con el montaje en solución fisiológica al examinar heces u otros materiales p/detectar protozoos intestinales o huevos de helmintos.</p> <p>El iodo tiñe núcleos y organelas intracitoplasmáticas de modo que se visualicen con más facilidad.</p> <p>No se puede usar en reemplazo del montaje en solución fisiológica, pues el iodo paraliza la movilidad de bacterias y trofozoítos.</p>	<p>Suspender sobre un portaobjeto en una gota de solución de lugol, una pequeña cantidad de materia fecal u otro material. Mezclar y colocar un cubreobjeto.</p> <p>Examinar al microscopio.</p> <p>En caso que se deba demorar la observación o se desee un preparado semipermanente para futuros estudios, sellar los bordes.</p>

<p><i>Montaje en hidróxido de potasio (KOH)</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. KOH 10% acuoso</li> <li>2. Portaobjeto</li> <li>3. Cubreobjeto</li> <li>4. Esmalte de uña o Vaspar</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ayuda a detectar elementos fúngicos en muestras que contienen queratina (piel, pelo, uña).</li> <li>- El KOH disuelve la queratina de fondo desenmascarando los elementos fúngicos hasta hacerlos más visibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suspender en una gota de KOH al 10 % costras de piel, pelo o uñas.</li> <li>- Colocar un cubreobjeto y dejar asentar a temperatura ambiente aprox. 30 min. El preparado se puede calentar suavemente en la llama de un mechero para acelerar el proceso de aclaramiento. No dejar hervir.</li> <li>- Examinar al microscopio p/ detectar hifas/esporos.</li> </ul>
<p><i>Técnica de la tinta china</i></p> <p>Tinta china o nigrosina</p> <p>Portaobjeto</p> <p>Cubreobjeto</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Observación microscópica directa de cápsulas de varios microorganismos. La tinta china da un fondo semiopaco contra el cual se pueden ver fácilmente las cápsulas claras.</li> <li>Ej. cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i> en liq. Cefalorraquídeo (LCR) u otras secreciones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Centrifugar ligeramente el LCR u otra muestra líquida, para concentrar los microorganismos en el sedimento.</li> <li>- Emulsionar sobre un portaobjeto una pequeña cantidad de sedimento en una gota de tinta china y colocar un cubreobjeto. La emulsión de contraste no debe ser muy espesa, ya que puede bloquear totalmente la luz transmitida.</li> <li>- Evaluar al microscopio con objetivo de 10x para "screening" y con 40x para confirmar la presencia de microorganismos capsulados sospechosos.</li> </ul>
<p><i>Examen en campo oscuro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Microscopio compuesto, equipado con condensador de campo oscuro</li> <li>- Portaobjeto</li> <li>- Cubreobjeto</li> <li>- Solución fisiológica</li> <li>- Esmalte de uña o Vaspar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualizar ciertos microorganismos delicados, que son invisibles en campo brillante y se tiñen con dificultad.</li> <li>- Especialmente útil para detectar espiroquetas en materiales biológicos, sobre todo en orina con sospecha de contener leptospiras o en chancros sifilíticos en los que se sospecha la presencia de <i>Treponema pallidum</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se recoge una pequeña porción del material sobre un portaobjeto. Colocar un cubreobjeto.</li> <li>- Examinar directamente con un microscopio provisto de condensador de campo oscuro con objetivo de 40x o 100x.</li> <li>Las espiroquetas aparecen como "tirabuzones" móviles y brillantes contra un fondo negro.</li> </ul>
<p><i>Reacción de Neufeld "quellung"</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suero anticapsular homólogo</li> <li>- Solución fisiológica</li> <li>- Portaobjeto</li> <li>- Cubreobjeto</li> </ul>	<p>Cuando las bacterias capsuladas se ponen en contacto con suero que contiene anticuerpo anticapsular homólogo, sus cápsulas sufren un hinchamiento visible al microscopio.</p> <p>Esta técnica serológica es útil para identificar en diversos tipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> líquidos biológicos o cultivos.</p>	<p>Extender un asa del material sobre un área de 1 cm en ambos extremos de un portaobjeto.</p> <p>Dejar secar y extender sobre una de las áreas un asa de suero tipificador anticapsular específico y sobre la otra un asa de solución salina como control.</p> <p>Colocar sendos cubreobjetos y examinar al microscopio con objetivo de 100x de inmersión con aceite.</p> <p>Los organismos que exhiben una reacción positiva aparecen rodeados de un halo refringente y traslúcido producido por la opacificación capsular. Comparar con el control de solución salina, donde no debe observarse hinchamiento de cápsulas</p>

<p><i>Técnica de la gota pendiente</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Portaobjeto de gota pendiente (es de vidrio grueso, con concavidad central en la superficie superior)</li><li>- Cubreobjeto</li><li>- Solución fisiológica</li><li>- Esmalte de uña / Vaspar</li></ul>	<p>Persigue el mismo propósito que el montaje con solución fisiológica, salvo que hay menor distorsión por el peso del cubreobjeto y se puede lograr un campo de foco más profundo dentro de la gota.</p> <p>Se usa generalmente para estudiar movilidad de bacterias.</p>	<p>Colocar una pequeña cantidad de Vaspar alrededor del borde de la concavidad de la superficie superior de un portaobjeto de gota pendiente.</p> <p>En el centro del cubreobjeto, suspender las células de la colonia bacteriana en examen en una gota de agua o sn. salina. Invertir el portaobjeto y presionarlo sobre el cubreobjeto, guiando la gota de suspensión bacteriana hacia el centro de la concavidad. Volver cuidadosamente el portaobjeto a la posición normal para el examen microscópico directo.</p>
---	--	---



## Desarrollo Práctico N° 3

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS. EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

#### 1.EXAMEN MACROSCÓPICO

Se dispondrá de distintas muestras para realizar la observación y descripción macroscópica.

Registrar datos tales como (de acuerdo con el tipo de muestra): cantidad, olor, color, aspecto, consistencia, presencia de gas, gránulos, sedimento macroscópico, pH, etc.

#### 2.EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

Realizar las distintas técnicas de examen microscópico directo, según el Cuadro N°1.

- Montaje en solución fisiológica
- Montaje en Iodo
- Montaje en hidróxido de potasio
- Técnica de tinta china
- Examen en campo oscuro
- Reacción de Neufeld “quellung”
- Técnica de la gota pendiente

Esquematizar en cada caso las observaciones microscópicas realizadas.

Indicar aumento del objetivo que realiza la observación (10x; 40x, etc.).

Jerarquizar las medidas relativas de los distintos elementos visualizados.

#### BIBLIOGRAFIA

*Diagnóstico Microbiológico*. Koneman Elmer y cols. Editorial Panamericana, 1983.

*Manual de Infecciones bacterianas agudas*. Gardner-Provine. Ed. Panamericana, 1979.

*Biología de los microorganismos*. Brock y col. Ed. Omega S.A. Ed. 1995.

*Atlas de microscopía*. Bernis Mateu J. Ediciones Jover, 1995.

*Diagnóstico Microbiológico*. Bailey Scott. Editorial Panamericana, 1983.



## Trabajo Práctico N° 4

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN. GRAM

#### PRINCIPIOS GENERALES DE LAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN

Por lo general, las bacterias y otros microorganismos son transparentes, y ello dificulta el estudio de los detalles morfológicos cuando se los examina en su estado natural. Los primitivos métodos de fijación y coloración iniciados por Paul Erlich y Robert Koch permitieron distinguir detalles estructurales que antes no se veían.

Se aconseja utilizar cultivos jóvenes para los métodos de coloración de rutina. Las células viejas pierden su afinidad para la mayoría de los colorantes. Salvo que se trate de organismos que tengan un tiempo de generación muy prolongado, los mejores resultados se deben esperar de un cultivo de 24 horas.

#### PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

Para los métodos de coloración en general, el primer paso lo constituye la preparación del extendido.

1- Recoger por medio de un ansa el cultivo o la muestra líquida y extender sobre una parte de un portaobjeto limpio y desengrasado, hasta formar una película. Si se parte de una colonia de un cultivo se suspende sobre una gota de agua colocada en el portaobjeto, extendiendo con el ansa la suspensión. La película debe ser homogénea.

2- En ningún caso la mezcla o el extendido se harán enérgicamente; esto resulta potencialmente peligroso cuando se trabaja con material patológico porque puede crear aerosoles. Además el tratamiento brusco tiende a destruir la disposición característica de las células, como las cadenas estreptocócicas y otras.

3- Dejar secar el extendido con el aire y luego, si es necesario, fijarlo por medio del calor pasándolo suavemente por una llama de Bunsen para que las células se adhieran al portaobjetos. El recalentamiento ocasiona deformaciones y por eso debe evitarse.

4- Dejar enfriar el portaobjetos.

5- Cuando se va a examinar un gran número de cultivos por medio de un método de tinción de rutina, como la coloración de Gram, se harán varios pequeños extendidos en un mismo portaobjeto, en secciones demarcadas previamente.

#### COLORACIÓN DE LAS BACTERIAS

##### • COLORACIÓN SIMPLE

1- Fijación del extendido.

2- Cubrir el extendido con el colorante (violeta cristal, fucsina, azul de metileno o safranina).

3- Dejar reaccionar el tiempo necesario (30 segundos a 3 minutos, según el colorante).

4- Lavar suavemente con un chorro de agua.

5- Secar entre dos pliegos de papel de filtro y examinar bajo lente con aceite de inmersión.

6- Es buena práctica desechar el papel secante utilizado en este procedimiento y en otros que intervengan microorganismos patógenos.

7- Los portaobjetos, si no se conservan como elemento de referencia, se colocarán en desinfectante.

**CUADRO 4.1. TINCIÓN SIMPLE. AZUL DE METILENO DE LOEFLER**

Tinción	Componentes	Propósito
<i>Azul de metileno de Loeffler</i>	Azul de metileno 0,3 gr Etanol, 95% 30,0 ml Agua destilada 100,0 ml	Coloración simple directa empleada para revelar morfología de microorganismos, y específicamente en la identificación de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , en el cual los gránulos metacromáticos se tiñen intensamente diferenciándose del citoplasma azul más claro.

• **COLORACIONES ESPECIALES**

**Coloración de Gram**

La fórmula de los colorantes utilizados en la técnica de Gram se expone en el Cuadro 4.2. El cristal violeta (o violeta de Genciana) actúa como colorante primario, que se une a la pared celular bacteriana luego de un tratamiento con una solución débil de yodo (mordiente). Algunas especies bacterianas, debido a la naturaleza química de sus paredes celulares, poseen la capacidad de retener el cristal violeta, aún luego del tratamiento con un decolorante orgánico, tal como una mezcla de acetona y alcohol. Tales bacterias se denominan Gram positivas.

Las bacterias Gram negativas, presumiblemente debido a un mayor contenido lipídico en su pared celular, pierden la coloración primaria del cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante.

El colorante secundario, contracolor utilizado es la safranina/fucsina básica. Las bacterias Gram negativas que han perdido el cristal violeta aparecen rojas o rosadas vistas al microscopio, habiendo fijado la safranina como contracolor a sus paredes celulares.

**CUADRO 4.2. TINCIÓN ESPECIAL. COLORACIÓN DE GRAM**

Tinción	Componentes	Propósito
<i>Coloración de Gram</i>	Cristal violeta: • Cristal violeta 2,0 gr • Etanol 20,0 ml • Oxalato de NH <sub>4</sub> 0,8 gr • Agua destilada 100,0 ml  Iodo de Gram: • Ioduro de potasio 2,0 gr • Iodo (cristales) 1,0 gr • Agua destilada 100,0 ml  Decolorante: • Acetona 50,0 ml • Etanol, 95% 50,0 ml  Contracolor: • Safranina 2,5 ml • Etanol 95% 100,0 ml  Añadir 10 ml a: Agua destilada 100,0 ml	Coloración diferencial utilizada para demostrar las propiedades tintoriales de todos los tipos de bacterias.  Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta tras la decoloración y aparecen de color azul intenso.  Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el cristal violeta tras la decoloración y se contracoloran de rojo con la safranina.  Las características de la coloración de Gram pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos muertos o en degeneración.

**TÉCNICA DE LA TINCIÓN DE GRAM**

- 1- Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire.
- 2- Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto dos o tres veces por la llama de un mechero de Bunsen.

3- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.

4- Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua.

5- Cubrir el preparado con yodo de Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.

6- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas de decolorante acetonaalcohol hasta no arrastrar más colorante violeta. Esto requiere habitualmente unos 10 segundos o menos.

7- Lavar con agua corriente y colocar nuevamente el portaobjeto sobre el soporte. Cubrir la superficie con contracolor safranina durante un minuto. Lavar con agua corriente.

8- Colocar el preparado en un soporte de tinción en posición vertical, dejando que escurra el exceso de agua y que se seque el extendido.

9- Examinar el preparado al microscopio con objetivo de 100x de inmersión (aceite). Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro; las bacterias Gram negativas aparecen rojorosas.

### EXAMEN DEL EXTENDIDO COLOREADO CON EL GRAM

Pueden reducirse los errores de interpretación y el tiempo necesario para el examen de los extendidos coloreados con el Gram mediante el examen sistemático del portaobjeto, de la siguiente manera:

1- Un breve *examen macroscópico* del portaobjeto informará al examinador si la sustancia colorante ha quedado en el portaobjeto, qué lado del mismo está coloreado, y si el frotis es demasiado grueso o está poco decolorado o muy decolorado.

2- *Con poco aumento, evaluar la conveniencia del espécimen*

a- La señal de infección bacteriana aguda es la presencia de leucocitos polimorfonucleares.

b- La ausencia de granulocitos o la presencia de un número importante de células epiteliales o de otro tipo indicará la probabilidad de que el espécimen no sea el adecuado. Se tratará de recolectar una nueva muestra.

c- Con poco aumento, en general es posible diferenciar los granulocitos de las células epiteliales y esto permite al observador concentrarse en áreas con predominio de células inflamatorias.

d- Con poco aumento se ven a menudo grandes formas fúngicas y por lo común es posible determinar las características de coloración de los núcleos celulares.

e- La lente de inmersión en aceite (100x) se usará cuando se buscan bacterias.

3- Mediante la lente de inmersión en aceite, *evaluar la conveniencia técnica de la coloración*. Hay que insistir en que la mayoría de los errores de interpretación de los frotis coloreados con el Gram se deben a errores en la preparación del portaobjeto, con un extendido demasiado grueso, excesiva fijación por el calor que puede alterar la morfología normal de las bacterias y células, y decoloración escasa o excesiva.

a- Se puede evaluar con rapidez si la coloración por el Gram es adecuada, comparando diferentes áreas del portaobjeto (con lente de inmersión en aceite). Las variaciones en los resultados de la coloración se observan en la figura 2-4. Los núcleos granulocitos y los organismos Gram negativos en un área delgada del frotis deberán colorearse de rojo, y los organismos Gram positivos de púrpura (Fig. 2-4 C). El hallazgo de bacterias rojas próximas a elementos celulares ligeramente purpúreos (decoloración marginal) en una parte más gruesa del frotis, confirmará que se encuentran organismos Gram negativos (Fig. 2-4 B) y que no son bacterias Gram positivas decoloradas en exceso (Fig. 2-4 D). Los campos totalmente poco decolorados (Fig. 2-4 A) indican sólo la presencia de bacterias pero no por fuerza sus características de coloración.

b- Puede controlarse la técnica de coloración de Gram coloreando una muestra de flora bucal por ejemplo, que contiene organismos Gram negativos y Gram positivos y células epiteliales.

c- Si el frotis coloreado con el Gram es técnicamente inadecuado, hacer uno nuevo y volver a colorearlo.

4- *Cuidado con los artificios.* El material Gram positivo de forma irregular es precipitado de ordinario por la coloración de Gram más que los cocos Gram positivos; a menudo los granulocitos próximos resultan menos coloreados que las partes más finas del frotis.

5- *Recordar que los organismos Gram positivos viejos, muertos o tratados con antibióticos, pueden aparecer como Gram negativos.* Porque sus propiedades físicas y químicas están alteradas y sus paredes celulares son más permeables al agente decolorante y hay menor retención del colorante principal.

6- *Examinar el fondo.* Allí pueden esconderse bacterias Gram negativas difíciles de observar, como Nocardias.

7- *Examinar varias áreas del frotis.* Aun cuando los organismos vistos en la primera observación pueden confirmar nuestras sospechas.

8- *No interpretar con demasiado entusiasmo lo que se ve.* Se debe describir lo que se observa, por ejemplo, cocos Gram positivos en pares, e interpretar la observación junto con otros datos, reconociendo las limitaciones de la descripción morfológica para establecer una etiología específica.

9- *Tratar de hallar más de uno de los organismos antes de sacar conclusiones,* generalmente “una golondrina no hace verano”. Aunque los organismos sean escasos es raro encontrar sólo uno o dos después de una búsqueda prolija. Cuando hay dudas, conviene más hacer otro frotis en vez de buscar exhaustivamente en el mismo.

Reconocer las limitaciones de la coloración de Gram. No constituye un método para cápsulas, esporas, micobacterias u hongos que no sean algunas formas de levaduras. Esta coloración puede proporcionar indicios de la presencia de cápsulas o esporos; por ello, deberán usarse otros medios de coloración más específicos para destacar estas estructuras.

a- Las micobacterias no captan bien la coloración de Gram, si hay sospecha de ello proceder a una coloración ácido-resistente.

b- Los hongos son por lo general, de tamaño elefantiásico en comparación con la mayoría de las bacterias. Si bien los hongos son nominalmente Gram positivos la mayoría se revela mal o no se revela. Como excepción algunas levaduras se colorean como Gram positivas. Se detectan mejor los hongos con un montaje húmedo conveniente, examinado con objetivo seco de gran aumento.

11- *Familiarizarse con el hábitat normal, el tamaño promedio y las características de coloración óptimas de las bacterias* (figs. 2-5).

12- *Conservar el frotis.* Es parte importante de los datos básicos de la muestra. El portaobjeto debe guardarse o agregarse al informe. La inmersión en aceite se limpiará con xilol o por medio de papel absorbente.

## **COLORACIÓN DE CÁPSULAS**

La cápsula de las bacterias no tiene la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de la célula, y por eso exige el empleo de métodos de coloraciones especiales. Ejemplos:

- Método de Anthony
- Método de Muir
- Método de Hiss
- Otros

## **COLORACIÓN DE ESPORAS**

Las esporas son relativamente resistentes a los agentes físicos y químicos y no se colorean con facilidad. En la coloración de Gram aparecen como cuerpos refráctiles no coloreados. En general, en los métodos especiales de coloración se requiere el calor para permitir la penetración del colorante en las esporas. Estas pueden descubrirse en el examen con campo oscuro. Ejemplo:

- Método de Dorner o su modificación

**COLORACIÓN DE FLAGELOS**

Los flagelos son apéndices frágiles, termolábiles y requieren un trato cuidadoso y la coloración por procedimientos especiales. El éxito de la coloración depende de la frescura y la eficacia del mordiente. Como los flagelos se hallan fuera del poder de resolución del microscopio óptico, para poder visualizarlos es necesario aumentar su tamaño. Esto se consigue cubriendo su superficie con un precipitado de una suspensión coloidal inestable (el mordiente). El precipitado sirve como una capa de material teñible y cuando se aplica el colorante adecuado aparece la estructura filamentosa de los flagelos. Ejemplo:

Método de Gray

**COLORACIÓN DE GRÁNULOS METACROMÁTICOS**

Existen diversos métodos para la coloración de gránulos metacromáticos. Se consideran las más usadas :

- Coloración con azul de metileno
- Coloración de Albert

**COLORACIÓN DE ESPIROQUETAS**

En general, las espiroquetas tienen poca afinidad para los colorantes estándar y requieren métodos y colorantes especiales, como el método de impregnación argéntica conocido con el nombre de Coloración de Fontana-Tribondeau.

## Desarrollo Práctico N° 4

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN. GRAM

#### 1- COLORACIÓN DE AZUL DE METILENO

##### a) Materiales necesarios

- Portaobjetos
- Ansas
- Mecheros
- Hisopos
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Cultivos bacterianos y de hongos
- Muestras
- Bandeja para coloraciones
- Pipetas

##### b) COLORANTES

- Azul de metileno al 0,3 gr%

#### 2-COLORACIÓN DE GRAM

Materiales necesarios: Ídem (1)

- b) Colorantes de Gram

#### I- CRISTAL VIOLETA

##### Solución A

- Cristal violeta 20 gr
  - Alcohol etílico 200 ml
- Mezclar y disolver

##### Solución B

- Oxalato de amonio 0,8 gr
  - Agua destilada 80,0 ml
- Mezclar y disolver

1- Agregar la solución A a la solución B

2- Conservar durante 24 horas

3- Filtrar antes de su empleo

#### II- SOLUCIÓN DE IODO DE GRAM

- Cristales de yodo 1 gr
- Ioduro de potasio 2 gr
- Agua destilada 300 ml

1- Moler las sustancias sólidas en unos 20 ml de agua

2- Agregar el resto líquido

3- Filtrar en frasco color caramelo

4- Guardar a resguardo de la luz, desecharlo cuando el color comienza a aclararse

#### III- SOLUCIÓN DECOLORANTE

- Alcohol 95° 400 ml
- Acetona 100 ml

#### IV- SOLUCIÓN DE FUCSINA

- Fucsina básica 4 gr
- Fenol 8 ml
- Alcohol absoluto 20 ml
- Agua destilada 100 ml

Disolver la fucsina básica en el alcohol y agregar lentamente el agua mientras se agita, luego agregar el fenol fundido.



**TÉCNICA**

Se seguirán los pasos descritos en los contenidos teóricos de coloración de Gram

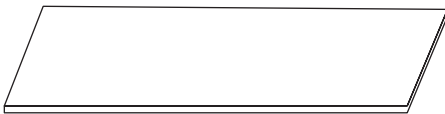
- 1º) Preparación de la muestra y/o suspensiones según indicaciones del instructor
- 2º) Preparación de extendidos
- 3º) Coloración y observación

**BIBLIOGRAFÍA**

- Diagnóstico Microbiológico.* Koneman Elmer y cols. Editorial Panamericana. 1983.  
*Manual de Infecciones bacterianas agudas.* Gardner-Provine. Ed. Panamericana. 1979.  
*Biología de los microorganismos.* Brock y col. Ed. Omega S.A. 1995.  
*Atlas de microscopía.* Bernis Mateu J. Ediciones Jover. 1995.  
*Diagnóstico Microbiológico.* Bailey-Scott. Editorial Panamericana. 1983.


**COLORACIÓN DE GRAM**

Fig. 2-3 Método de coloración de Gram



Preparar un frotis fino. Dejar secar el aire y fijar por calentamiento.

**1**



- Bañar con violeta de cristal durante 10 segundos.

**2**

- Bañar con yodo de Grama durante 10 segundos.  
- Enjuagar.

**3**

- Paso crítico: Decolorar y enjuagar

**4**

- Bañar con colorante de contraste saframina durante 10 segundos.  
- Enjuagar.  
- Secar al aire o con papel absorbente.

Fig.- 2-4 Posibles variaciones de una coloración con el Gram ideal

**Ideal**  
↓

**A**

**B**

**C**

**D**

Fig. 2-5 Morfología y características de coloración con el Gram de organismos de hallazgo común en especímenes clínicos.

Los organismos de tamaño mediano, que aquí se muestran en escala y como aparecen en condiciones óptimas, se observan por lo general a 1.000 X (lente de inmersión en aceite).

- |   |  |
|---|--|
| ① <i>Staphylococcus</i>                                     | ⑫ <i>Candida</i>   |
| ② <i>Streptococcus</i> y neumococos                         | ⑬ <i>Asperigillus</i> (los hongos superiores por lo general no captan coloración con Gram)         |
| ③ <i>Neisseria</i>  | ⑭ <i>Bacteroides</i>   |
| ④ Leucocito polimorfonuclear                                | ⑮ <i>Haemophilus</i> (y otros organismos, a menudo raros, como <i>Pasteurella</i> )                |
| ⑤ <i>Listeria</i>   | ⑯ <i>Vibrio</i>  |
| ⑥ <i>Acinetobacterium</i> ( <i>Mima</i> , <i>Herellea</i> ) | ⑰ <i>Pseudomonas</i>   |
| ⑦ <i>Micrococcus</i>  | ⑱ <i>Enterovacteriaceae</i> ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , etc.) |
| ⑧ <i>Corynebacterium</i> (difteroides)                      | ⑲ <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> o <i>Lactobacillus</i>                                      |
| ⑨ <i>Nocardia</i> o <i>Actinomyces</i>                      |  |
| ⑩ Célula epitelial  |  |
| ⑪ <i>Fusobacterium</i> y <i>Borrelia</i>                    |  |

## Trabajo Práctico N° 5

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

#### PRINCIPIOS GENERALES DE LAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE

Otra técnica de coloración diferencial que depende de la composición química de la célula bacteriana es la coloración ácido-alcohol resistente, que se emplea en la tinción de bacilos tuberculosos y otras micobacterias. Estos contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga de 50-90 átomos de carbono, que les confieren la propiedad de impermeabilidad a los colorantes y su ácido-alcohol resistencia en las tinciones, resistencia a la acción letal de ácidos y álcalis, resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos.

La tinción de estos microorganismos resulta difícil con los colorantes habituales, se usan colorantes básicos, con el agregado de un volumen controlado de ácido, y se aplican generalmente con calor. Una vez coloreado, el bacilo tuberculoso es resistente al tratamiento siguiente con alcohol ácido, mientras que la mayoría de las demás bacterias pierde su coloración. Para la mejor apreciación, se aplica un colorante de fondo que contrasta con el bacilo. El método que se emplea con mayor frecuencia es el de Ziehl-Neelsen, aun cuando también se recomienda el procedimiento con fluorocromo.

Los microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, *Cryptosporidium* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistente. Son difíciles de colorear y, una vez logrado esto, no se decoloran con facilidad. Se han presentado muchas teorías para explicar esta propiedad de la resistencia ácida. El criterio más aceptable es que la misma está determinada por la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática. La brillantez del color rojo se debe a la retención del colorante, carbolfucsina, en solución dentro de la célula. Si la célula se desorganizara mecánicamente, se perdería su propiedad ácido-alcohol resistente.

#### COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

1- Colocar un trozo de papel de filtro que cubra el frotis sobre el portaobjeto fijado por el calor, después inundar el portaobjeto (y el papel) con carbolfucsina. Cubriendo el frotis con papel de filtro se impide su desecación cuando se lo somete al vapor y los posibles artificios resultantes.

2- Someter al vapor durante 3-5 minutos (no hervir ni deshidratar). Dejar descansar cinco minutos. **Lavar el portaobjeto** (quitando el papel de filtro) con agua corriente, en chorro lento.

3- **Decolorar** completamente con alcohol-ácido hasta que no aparezca color en el líquido de lavado. Enjuagar con agua.

4- **Coloración de fondo** con un colorante de contraste como el azul de metileno o verde malaquita. Enjuagar con agua, dejar secar al aire. Observar con lente de inmersión en aceite.

**Resultados:** los bacilos ácido-resistentes se teñirán de rojo; el fondo, los elementos celulares, y las bacterias que no son ácido-alcohol resistentes tomarán el color del colorante de contraste (azul/verde).

#### FUNDAMENTO DE LA COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

El *fenol* forma parte del colorante, es soluble en lípidos, y estos son importantes componentes de las bacterias ácido-alcohol resistentes.

El *calentamiento* favorece la solubilidad y por lo tanto la penetración en la micobacteria. El fenol también es soluble en alcohol y agua, aunque en menor grado que en lípidos.

El fenol con la fucsina forman el compuesto fenol-color (FC). Al ponerse este compuesto en presencia del citoplasma bacteriano, el fenol se encuentra en un medio donde su coeficiente de solubilidad es mayor y por lo tanto FC se fijará fuertemente y coloreará de rojo la bacteria.

En el tercer paso de la técnica se agrega alcohol-ácido. Debido a la permeabilidad especial de la membrana citoplasmática, penetran con dificultad y se encuentran con FC. El fenol se encuentra con dos sustancias en las cuales es soluble, pero como lo es más en los lípidos, la mayor parte del color quedará en el citoplasma y una pequeña cantidad se perderá por solubilización en ácidos y alcohol. Este paso, el de la *decoloración*, es *muy importante*, y después de lavar con agua se debe observar a trasluz si no quedó colorante, caso contrario se repite el procedimiento hasta que las partes delgadas del preparado queden incoloras y las partes más gruesas rosadas.

Si se produce destrucción de la pared bacteriana, ya sea por medios físicos, químicos, quimioterápicos, antibióticos, etc., la capacidad de ácido-alcohol resistencia se pierde porque el alcohol y el ácido entrarán en forma masiva y arrastrarán el colorante.

En general, la afinidad por el colorante está dada por el coeficiente de solubilidad del fenol en los lípidos y por la resistencia de la membrana a la penetración de los colorantes.

#### **EXAMEN DEL FROTIS TRATADO CON COLORACIÓN ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE**

1- Con lente de inmersión, los bacilos ácido-alcohol resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* son típicamente bastoncillos delgados, apenas curvos, que se tiñen de rojo. Pueden estar unidos formando cuerdas o como “cuentas de rosario” por la presencia en el cuerpo bacilar de puntos más coloreados.

2- En un frotis grueso o decolorado de modo insuficiente son posibles artificios ácido-resistentes, como así también raspaduras del portaobjeto. Solo los microorganismos morfológicamente definidos deberán considerarse como bacilos ácido-resistentes.

3- Si solo se encuentran algunos organismos ácido-resistentes, se deberá repetir el frotis.

4- Debe examinarse el frotis por lo menos durante 10 a 15 minutos (30 minutos o más para muestras de LCR) antes de descartarlo como negativo.

5- No es posible efectuar la determinación de la especie de un organismo sobre la base de una coloración ácido-resistente de la muestra sola.

6- La ácido-alcohol resistencia de un organismo puede variar por factores como la edad, exposición a drogas, etc.; también de acuerdo con el método de coloración. El *Mycobacterium tuberculosis* es ácido-alcohol-resistente en forma constante, pero no así el *M. leprae*, *Nocardia* y otros que se consideran solamente ácido-resistentes.

## Desarrollo Práctico N° 5

### MÉTODOS ÓPTICOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

#### COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

##### a) Materiales necesarios

- Portaobjetos
- Ansas
- Mecheros
- Hisopos
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Muestras
- Bandeja para coloraciones
- Pipetas

##### b) Colorantes

**Solución 1:** carbolfucsina / fucsina fenicada

**Solución 2:** decolorante: Alcohol-ácido  
Alcohol 95<sup>a</sup> 485 ml  
Ácido clorhídrico puro 15 ml

**Solución 3:** solución de azul de metileno al 0,3%

#### Técnica

Tomar un portaobjeto sin ralladuras, limpio y desengrasado.

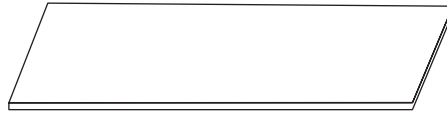
- 1- Depositar sobre él una ansada de esputo. Se quemará el ansa previamente inmersa en un frasco de arena con alcohol.
- 2- Secar y fijar a la llama.
- 3- Colocar el portaobjetos sobre la bandeja de coloración.
- 4- Cubrir con fucsina fenicada.
- 5- Pasar la llama de un hisopo (embebido en alcohol) debajo del portaobjeto hasta desprendimiento de vapores blancos. Suspender el calentamiento en ese momento. Dejar un minuto y repetir el procedimiento hasta tres veces, con la precaución de no secar el preparado y evitar ebullición.

- 6- Cubrir con la solución decolorante durante 10 segundos y lavar rápidamente con agua. Observar a trasluz la presencia de color rosado tenue en las partes más gruesas del preparado.
- 7- Cubrir con el colorante de contraste durante un minuto
- 8- Lavar con agua
- 9- Secar al aire
- 10- Observar y esquematizar

#### BIBLIOGRAFÍA

- Koneman Elmer y cols. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. 1983.
- Gardner-Provine. *Manual de Infecciones bacterianas agudas*. Ed. Panamericana. 1979.
- Brock y col. *Biología de los microorganismos*. Ed. Omega S.A. 1995.
- Bernis Mateu J. *Atlas de microscopía*. Ediciones Jover. 1995.
- Bailey – Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. 1983.

FIG. 2-9 Coloración ácido-recidente de Ziehl-Neelsen



Preparar un frotis fino. Dejar secar al aire libre y fijar por calentamiento.

1

2

Cubrir el frotis con papel de fieltro.  
Bañar con carbolfucsina.

Calentar a vapor 3-5 minutos. Dejar descansar. Enjuagar.

3

4

Decolorar con alcohol ácido hasta que el líquido aparezca limpio.

Contracolorar durante 20 segundos con azul de metileno. Enjuagar. Dejar secar al aire.

## Trabajo Práctico N° 6

### MEDIOS DE CULTIVO (1° PARTE)

#### INTRODUCCIÓN

Para el estudio de las características de las bacterias y diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas, es necesario obtener un cultivo puro de las mismas. Para ello se deben utilizar en el laboratorio, de acuerdo con sus necesidades particulares, medios de cultivo que les ofrezcan los nutrientes y las condiciones óptimas de crecimiento. En el siglo XX mucho se ha aprendido acerca de los requerimientos nutricionales de las bacterias y otros microorganismos y, con pocas excepciones, en la actualidad se puede cultivar en medios artificiales la mayoría de los gérmenes patógenos, fuera de su hábitat normal.

#### DEFINICIÓN

Se entiende por medio de cultivo al conjunto de nutrientes asimilables, balanceados en su concentración que, junto a factores ambientales adecuados, permiten el crecimiento y multiplicación de los microorganismos intentando reproducir artificialmente las condiciones de su hábitat natural.

#### UTILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se utilizan para una amplia variedad de propósitos en el laboratorio, tales como:

- 1- Aislamiento y propagación de bacterias, hongos y, en algunos casos, parásitos de animales y del hombre.
- 2- Estudio de las propiedades culturales, fisiológicas, metabólicas, morfológicas, antigénicas y patogénicas de los microorganismos que sirven, entre otras cosas, para su identificación. Por ejemplo: producción de ácido y gas, en medios de fermentación de hidratos de carbono o hemólisis de eritrocitos en medios de agar sangre, etc. Las variaciones en la composición del medio pueden alterar estas características.
- 3- Transporte y conservación de microorganismos.
- 4- Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- 5- Fabricación de antígenos para desarrollo de vacunas y preparación de suspensiones biológicas para diagnóstico serológico.
- 6- Selección de mutantes o variantes genéticas microbianas.

#### COMPOSICIÓN

Los medios de cultivo pueden contener una gran variedad de sustancias; deben incluir los elementos indispensables para satisfacer todas las necesidades nutricionales de los microorganismos que se desea estudiar. A continuación se señalan los componentes más importantes:

- 1- Agua:** constituye aproximadamente el 80-95% del medio de cultivo, permitiendo mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.
- 2- Peptonas:** se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. Se denominan según el origen de la proteína, por ej: de gelatina, de carne, de soja o de lactalbúmina. Constituyen una fuente fundamental de nitrógeno, pero también de carbono y azufre.
- 3- Extractos de carne vacuna:** son concentrados de productos hidrosolubles de la carne de composición indefinida (corazón, cerebro, músculo o hígado de buey), aportan elementos muy ricos como xantina, glucógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.

**4- Hidratos de carbono:** los medios de cultivo pueden contener cualquier clase de mono, di y polisacárido; se los usa habitualmente como fuente de energía para el germen, o de lo contrario para el estudio de su capacidad fermentativa.

**5- Minerales:** habitualmente se los usa en forma de sales inorgánicas. Los más utilizados son sodio, calcio, potasio, cloro, fósforo, azufre, hierro, cobre y magnesio; el uso de un determinado elemento depende de las exigencias del microorganismo en estudio.

**6- Factores de crecimiento:** otras sustancias que los microorganismos son incapaces de sintetizar por sí solos, como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidínicas.

**7- Agentes selectivos:** son sustancias químicas que, adicionadas al medio de cultivo, impiden el desarrollo de un grupo de bacterias sin inhibir otros. Son utilizados como agentes selectivos:

- **Colorantes:** por ejemplo, cristal violeta (inhibe bacterias Gram (+), verde brillante se usa en medios altamente selectivos p/eliminar la flora acompañante Gram(+) y Gram (-).

- **CINa:** en altas concentraciones inhibe a casi todas las bacterias excepto las halófilas.

- **pH:** ej. pH 5,6 en medio Sabouraud p/hongos; pH 8,0-9,0 para aislamiento de *Vibrio cholerae*.

- **Antimicrobianos:** cloranfenicol, cicloheximida, sulfamidas.

- **Agentes reductores:** se adicionan a los medios para hacerlos selectivos y proveer desarrollo de microorganismos anaerobios. Ej.: ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, cisteína, etc.

- **Otros agentes selectivos:** citrato de sodio, telurito de sodio, selenito de sodio, sales biliares, etc.

**8- Sustancias indicadoras:** sirven para detectar algunas propiedades metabólicas de los gérmenes. Ej. colorantes indicadores de pH como el azul de timol, rojo de fenol, azul de bromotimol; sales de hierro que detectan la producción de H<sub>2</sub>S produciendo ennegrecimiento del medio de cultivo; telurito de potasio que cuando se reduce a telurio confiere color negro a las colonias.

**9- Sustancias de enriquecimiento:** son sustancias que adicionadas al medio de cultivo permiten el desarrollo de microorganismos exigentes. Se emplea sangre total humana o de cualquier otro animal, o sus componentes (plasma, suero, etc.).

**10- Agentes solidificantes:** se le incorporan para obtener medios de cultivo sólidos o semisólidos. El más utilizado es el agar, que es un polímero extraído de algas rojas; aunque es líquido a 45°C-100°C, por debajo de 45°C comienza a solidificar, dando lugar a un gel resistente a la hidrólisis bacteriana.

## FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO

El desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo depende de una serie de factores; los más destacables son:

**1- Composición:** aceptores y donadores de H, fuente de C, fuente de N, minerales y factores de crecimiento.

**2- pH (concentración de iones hidrógeno).** La mayoría de los organismos tienen una gama de pH bastante estrecha, crecen mejor a pH de 6,0-8,0. Los acidófilos crecen a un pH menor de 5. Ej.: para *Thiobacillus thiooxidans*, pH óptimo=2,0; mientras que los basófilos desarrollan a pH superiores a 8. Ej.: *Alcaligenes faecalis* crece a pH=8,5. El ajuste se logra con NaOH o KOH y ClH. La estabilidad del pH se asegura mediante la adición de tampones como el sistema KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**3- Temperatura:** la temperatura óptima para el desarrollo de las diferentes especies microbianas varía ampliamente, las formas psicrófilas crecen mejor a temperaturas bajas entre 15-20°C, las mesófilas a 30-37°C, temperatura óptima para la mayoría de los microorganismos de interés médico, y las termófilas a 50-60°C.

**4- Atmósfera y potencial redox:** depende del tipo de respiración que posea el microorganismo, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, se incuban en presencia de O<sub>2</sub>; las anaerobias estrictas requieren un 85% de N<sub>2</sub> 10% de H<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> y los microaerófilos un 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub>.

**5- Fuerza iónica y presión osmótica:** en menor grado, puede ser necesario controlar factores como la presión osmótica y la concentración salina. La mayoría de los organismos crece bien en



medios ordinarios. Otros como las bacterias halófilas requieren altas concentraciones salinas, y las osmófilas requieren presiones osmóticas altas.

**6- Hidratación:** la presencia de agua es indispensable para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente.

### PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el comercio existe una gran variedad de medios de cultivo deshidratado que facilitan la labor de los laboratorios de microbiología y que garantizan una buena calidad de funcionamiento.

La preparación de los mismos se realiza de acuerdo con los siguientes pasos (Fig. 6.1):

- 1- Disolución del medio de cultivo deshidratado.
- 2- Ajuste de pH.
- 3- Fraccionamiento en tubos (este paso en algunos casos se puede obviar).
- 4- Esterilización.
- 5- Conservación de medios de cultivo listos para el uso.

**1- Disolución del medio de cultivo deshidratado.** El medio de cultivo deshidratado se pesa exactamente siguiendo las indicaciones del rótulo del envase y se coloca en un recipiente adecuado para su preparación; luego se rehidrata agregando aproximadamente la mitad de la cantidad necesaria de agua limpia, destilada/desmineralizada recientemente y cuya reacción sea lo más cercana a la neutralidad, y se agita 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 adheridas a la pared interna del recipiente. El recipiente con el medio de cultivo se calienta suavemente a baño de María o vapor para favorecer la disolución completa de la mezcla. Los medios de cultivo que no contienen agar ni gelatina (caldos) no requieren calentamiento, dado que los componentes son solubles en agua fría o templada.

**2- Ajuste de pH.** Cuando se utiliza agua neutra para su preparación, los medios de cultivo muestran el valor de pH indicado para cada uno de ellos, a la temperatura de incubación prescrita en cada caso. A pesar de todo, se recomienda comprobarlo, sobre todo en el caso de lotes no recientes, y proceder a su corrección si fuera necesario. Esto se realiza adicionando HCl 1N para acidificar, o NaOH 1N para alcalinizar.

**3- Esterilización.** Antes de su esterilización, y dentro de lo posible, es conveniente distribuir el medio en porciones más pequeñas, por ejemplo, en los recipientes definitivos en los que posteriormente se lleve a cabo el trabajo (excepto placas de Petri).

Si las normas de preparación no indican otra cosa, la esterilización se lleva a cabo en autoclave, a 121°C, durante 15 minutos. En algunos casos, los medios contienen sustancias termolábiles y requieren otro tipo de esterilización como el vapor fluente, la filtración por membrana, tindalización, etc.

Las temperaturas más altas y los calentamientos más prolongados que lo prescrito perjudican la calidad del medio de cultivo.

**4- Conservación de medios de cultivo, listos para el uso.** Una vez concluida la esterilización, los medios de cultivo preparados listos para su uso deben ser guardados en heladera a 4°C; de esta forma tienen un tiempo limitado de conservación. Cuando no se indique lo contrario se puede contar con una conservación de varios meses bajo condiciones adecuadas.

En caso de no disponer de heladera, es posible su conservación durante 1-2 semanas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

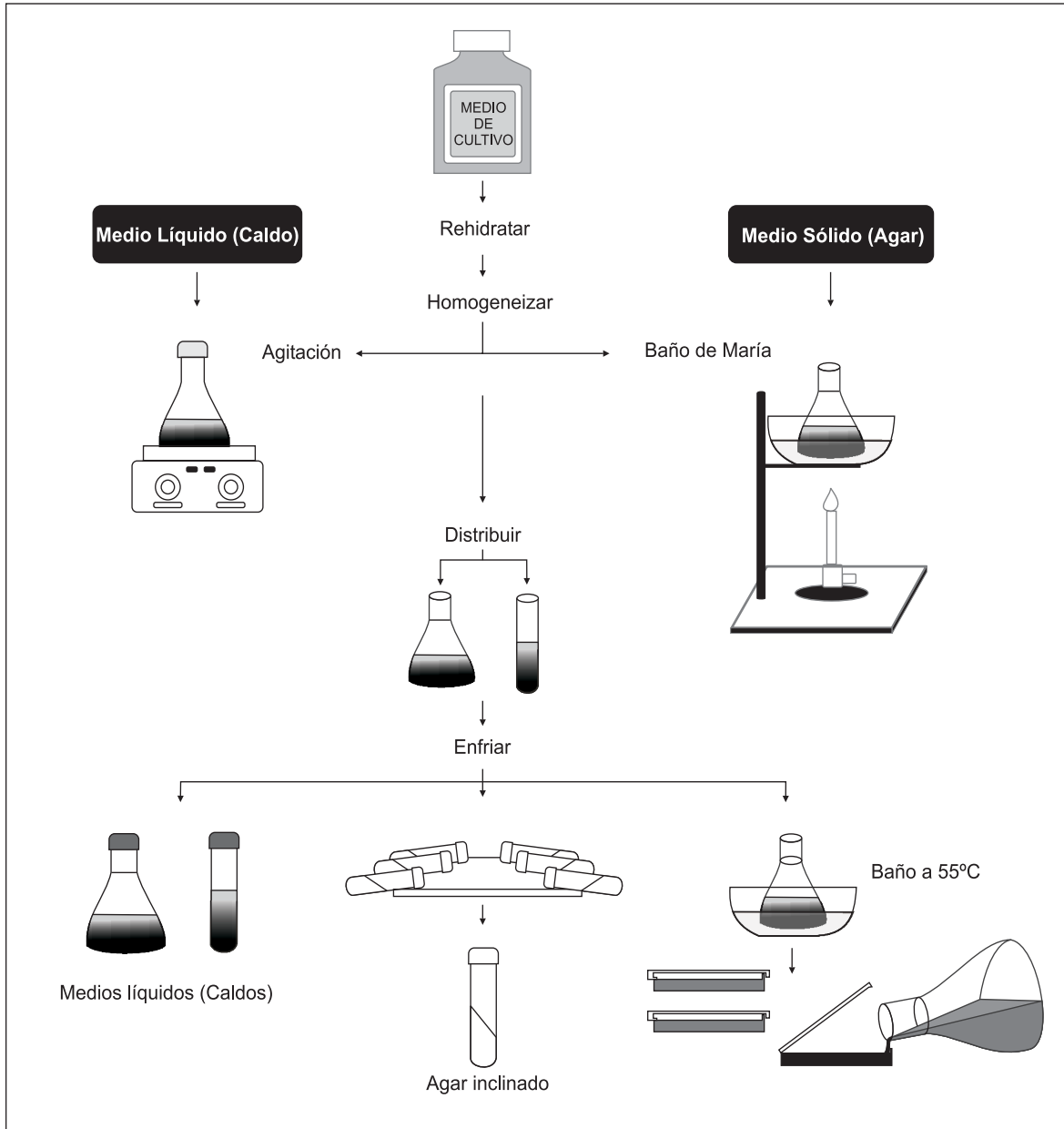
Deberán *protegerse contra el desecamiento* del medio de cultivo que contienen, precintando con cinta adhesiva su borde lateral o guardándolas empaquetadas en varias bolsas de plástico o film de polietileno impermeables al aire, o tapando con tapones de goma esterilizados.

Los medios de *cultivo líquidos*, envasados en tubos o matraces, deben cerrarse asimismo con capuchones impermeables al aire, o tapando con tapones de goma esterilizados.

En los *medios de cultivo* que contengan aditivos susceptibles de deteriorarse, conviene conservar el medio basal preparado, y completarlo cuando se necesite, mezclándole esterilmente los aditivos de dudosa conservación (termosensibles, gases tóxicos, etc.).

Los medios de cultivo conservados en heladera deberán trasladarse a la estufa de cultivo o a la mesada de trabajo, aproximadamente una hora antes de su empleo, con el objeto de templarlos para evitar *shock* térmico en los microorganismos.

**FIGURA 6.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**



**CUIDADOS O PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Para una buena preparación de los medios de cultivo se debe tener en cuenta:

- El empleo de instrumental de vidrio y equipos limpios, exentos de residuos de sustancias y detergentes. Los recipientes destinados a la preparación se limpiarán con agua destilada/desmineralizada.
- Los recipientes deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad.
- La tapa a rosca, tapón de plástico, han reemplazado al tapón de algodón para los tubos. Prevenir el empleo de tapas a presión.

- Los tubos que se enfrían bruscamente después de la esterilización reciben aire, el cual puede ser una fuente probable de contaminación cuando se guardan los tubos de medios de cultivo durante un largo período.
- No se recomienda el calentamiento directo sobre la llama. Se debe preferir el empleo de un baño de María o de vapor. La disolución completa de los ingredientes, en el volumen de agua necesario antes de la esterilización, dará un producto constante, homogéneo, uniforme y sin grumos.
- Los frascos que contienen medios de cultivo con agar se deben mezclar después de la esterilización: ello dará la consistencia uniforme para el cultivo en placas.
- Se ha comprobado que para disolver medios de agar deshidratado que deberán ser sometidos al proceso de autoclave conviene usar un horno de microondas, lo cual representa una considerable reducción de la generación de calor y una gran economía de tiempo.

#### **CONTROL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Antes de que un medio de cultivo sea considerado apto para ser utilizado se deben establecer tres tipos de controles.

**Control de esterilidad.** Se efectúa incubando durante 48 horas a 35°C y cinco días a temperatura ambiente algunas placas del lote, escogidas al azar. Se considerará apto, si al cabo de siete días los controles muestran ausencia de cualquier tipo de crecimiento.

**Control de calidad.** Se realiza para comprobar que el medio contiene aquellos componentes que lo caracterizan. Para las comprobaciones se utilizan dos gérmenes distintos, uno que crece en el medio o da positiva una determinada prueba, y otro que no crece o la da negativa.

**Control de caducidad.** Para ello, los medios deben estar perfectamente rotulados con nombre y fecha de preparación; de esta manera se podrá establecer en todo momento el tiempo que falta para llegar al límite de su utilización. Como término medio se pueden conservar en heladera a 4°C de 6 a 21 días si no se introducen en bolsa de plástico, y de 10 a 90 días si se guardan en bolsas selladas.

## Desarrollo Práctico N° 6

### MEDIOS DE CULTIVO (1° PARTE)

El instructor dispondrá para cada comisión de trabajo los medios de cultivo y material, necesarios para la preparación de los mismos.

#### MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizarán medios de cultivo comerciales deshidratados, en polvo o granulados para gérmenes comunes: líquidos, sólidos, semisólidos, selectivos, diferenciales, de enriquecimiento, enriquecidos, especiales, otros.

#### MATERIALES

##### MATERIAL DE VIDRIO

- Erlenmeyers
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Varillas de vidrio

##### OTROS MATERIALES

- Balanza analítica
- Papel para pesar
- Algodones
- Tapones de plástico, goma, etc.
- Mechero y trípode
- Recipiente para Baño de María
- Papel
- Hilo y/o gomitas
- Tiras de pH
- Solución de NaOH 1 N
- Solución de HCl 1 N

#### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1- Realizar el cálculo para pesar la cantidad del medio de cultivo deshidratado necesario para preparar la cantidad asignada por el instructor.

2- Disolver mediante calentamiento, en caso de ser necesario, acorde a las indicaciones dadas en la presente Guía.

3- Controlar el pH del medio.

4- Distribuir en los recipientes adecuados correctamente rotulados.

5- Acondicionar y esterilizar en autoclave.

6- Almacenar los medios de cultivo preparados.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Koneman Elmer y cols. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Bailey – Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Jawetz E. y cols. *Manual de Microbiología Médica*. Editorial El Manual Moderno S.A. 1979
- Stainer R. y cols. *Microbiología*. Editorial Reverté. S. A. 1996
- Lennette E. y cols. *Manual de Microbiología Clínica*. Editorial Panamericana. 1989
- Ureña J. L. *Microbiología Oral*. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana de España, S. A. U. 2002.
- Alvarez M. V. y cols. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. Editorial. 1996.

## Trabajo Práctico N° 7

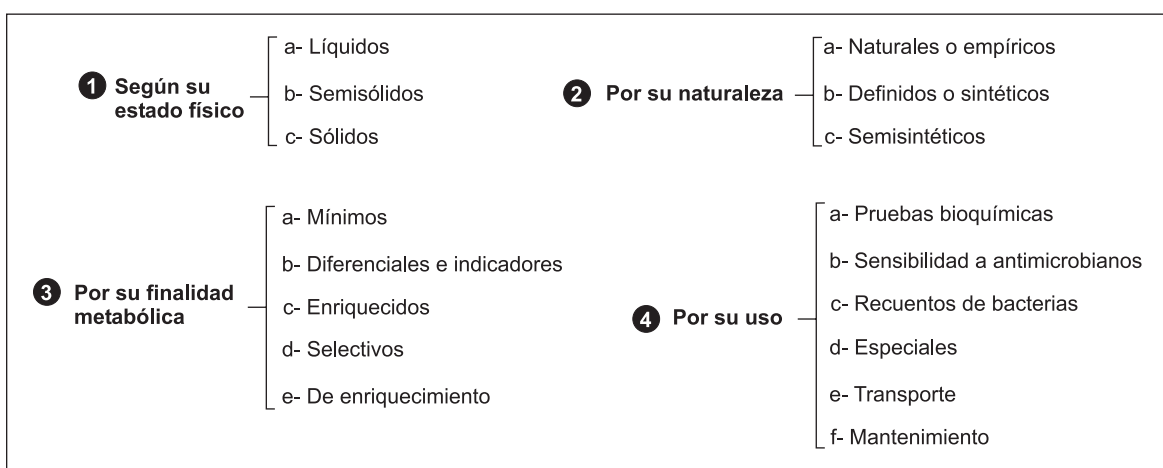
### MEDIOS DE CULTIVOS (2° PARTE)

#### INTRODUCCIÓN

Como no existe un medio de cultivo universal que cubra las necesidades de todas las bacterias, la elección del medio de cultivo a utilizar para determinadas bacterias se hace a partir de las necesidades nutritivas de estas, y del hábitat natural del que se recuperan.

#### CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

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



#### 1- SEGÚN SU ESTADO FÍSICO

<b>a- Líquidos</b>	Reciben el nombre de caldos. Los constituyentes están disueltos en agua sin sustancias solidificantes. Se utilizan sobre todo para inocular muestras o cuando se cultiva un único microorganismo para obtener una masa microbiana u observar las características de crecimiento; también sirven para elaborar las curvas de crecimiento. Ej. caldo tioglicolato, caldo cerebro-corazón, caldo nutritivo (CN).
<b>b- Semisólidos</b>	Contienen agar en escasa proporción (menos del 1%). Se utilizan como medios para analizar una o más características especiales de las bacterias, por ejemplo la movilidad; o por el medio SIM (Sulphidrilo-Indol-Movilidad). También se emplean como medio de transporte de muestras clínicas; medio de Stuart.
<b>c- Sólidos</b>	Contienen agar en una cantidad suficiente para que solidifiquen, generalmente 1,5-2%. Permiten el crecimiento de los microorganismos en el interior o en la superficie sólida. Ej. Agar nutritivo (AN), agar eosina-azul de metileno (EMB).

#### 2- POR SU NATURALEZA

<b>a- Naturales o empíricos</b>	Son aquellos que están constituidos por productos de origen animal o vegetal, gelatina, leche, huevo, suero, papa, levadura, zanahoria, etc. No se conoce su composición cuali ni cuantitativa. Ej. caldo de carne vacuna, agar papa, agar harina de maíz, medio arroz, agar hojas de clavel, etc.
<b>b- Definidos o Sintéticos</b>	Son aquellos de composición química conocida definida cuali y cuantitativamente. Poseen una composición constante y se utilizan para estudios de crecimiento y metabolismo bacteriano. Se elaboran añadiendo productos puros e individualizados.
<b>c- Semisintéticos</b>	Son medios que contienen sustancias químicas en proporciones conocidas junto a productos de origen natural. Ej. agar Mueller Hinton, agar sangre, agar chocolate, agar nutritivo, EMB, agar Sabouraud, etc.

### 3- POR SU FINALIDAD METABÓLICA

<p><b>a- Mínimos</b></p>	<p>Son de uso frecuente para el cultivo de microorganismos poco exigentes y contienen los nutrientes mínimos para el desarrollo. Su composición es muy simple: cloruro de sodio, extractos de carne, peptona y agua. Sirven para el desarrollo, aislamiento y conservación de microorganismos. También son utilizados como base para otros medios. Ej.: CN, AN, Agar tripteína soya (ATS).</p>
<p><b>b- Diferenciales e indicadores</b></p>	<p>Estos medios llevan incorporadas determinadas sustancias que pondrán de manifiesto visualmente la presencia de alguna característica metabólica o marcadores genéticos de microorganismos que están presentes en una mezcla, 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 clasificar las bacterias aisladas. Ej.: -Agar cisteína-lactosa deficiente en electrolitos (CLDE). Permite la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras. La degradación del hidrato de carbono a ácido origina un viraje de color hacia el amarillo del azul de bromotimol. La alcalinización provoca un viraje a azul intenso. Otros medios diferenciales de uso habitual son EMB, agar Mac Conkey, agar cetrimide, agar manitol salado, etc.</p>
<p><b>c- Enriquecidos</b></p>	<p>Son medios básicos que se suplementan con sustancias muy nutritivas para bacterias exigentes, como la sangre, el suero, etc. Ej.: -Agar sangre (AS), aporta el factor hemático X (Hemina), adecuado para el cultivo de Neumococos, Estreptococos y otras bacterias exigentes. También es un medio diferencial, debido a la hemólisis que producen determinados microorganismos. - Agar chocolate (ACh) aporta los factores hemáticos X y V (NAD; Nicotina adenina dinucleótido), utilizado para el aislamiento de <i>H. influenzae</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, <i>Neisseria meningitidis</i>. Algunos medios son considerados enriquecidos debido al alto contenido de nutrientes que poseen sin el agregado de otras sustancias. Ej.: -Caldo infusión cerebro-corazón (ICC).</p>
<p><b>d- Selectivos</b></p>	<p>Estos medios permiten el crecimiento de algunas bacterias e inhiben el de otras. Si los requerimientos de un microorganismo son conocidos, es posible desarrollar un conjunto de condiciones en las que su crecimiento específico sea favorecido y el de otros impedidos, permitiendo su aislamiento a partir de poblaciones mixtas aun cuando esté en menor proporción. La selección se puede conseguir ya sea añadiendo inhibidores (colorantes, antibióticos o sales biliares), modificando algunas propiedades físicas (concentración de cloruro de sodio, pH) o alterando algunas condiciones de cultivo como la temperatura y atmósfera de incubación (O<sub>2</sub>). Ej.: -<b>Agar EMB</b>: los colorantes integrantes de la fórmula inhiben los microorganismos Gram (+). Se usa p/aislamiento de bacilos entéricos. Permite diferenciación de <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i> y otros. <i>E. coli</i> se observa verdosa c/centro negro y brillo metálico, las otras más grandes, mucosas, confluentes c/centro pardogrisáceo. -<b>Agar Mc Conkey</b>: contiene mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe a microorganismos Gram (+); lactosa como fuente de C y rojo neutro como indicador de pH, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. -<b>Agar SS (agar Salmonella-Shigella)</b>: se utiliza para aislamiento de Salmonellas y Shigellas a partir de heces/alimentos. El verde brillante, sales biliares, alta concentración de tiosulfato y citrato, inhiben considerablemente la flora acompañante. -<b>Agar manitol salado</b>: posee alta concentración de NaCl (7,5%). Desarrollan Estafilococos patógenos. -<b>Agar Thayer Martin</b>: medio altamente selectivo, contiene vancomicina, colistín, trimetroprima y nistatina. Ideal p/aislamiento de gonococos y meningococos porque inhibe flora acompañante.</p>
<p><b>e- De enriquecimiento</b></p>	<p>Generalmente son caldos, destinados a promover el crecimiento de los microorganismos, Ej.: CN, o estimular el desarrollo de bacterias presentes en número escaso en una mezcla de varios grupos bacterianos. Ej.: Caldo Selenito que estimula el crecimiento de un número pequeño de Salmonellas presentes en heces y suprime el desarrollo de un número mucho mayor de microorganismos de la flora normal. Este es uno de los pocos medios que tiene una doble función, selectivo y de enriquecimiento.</p>

**4- POR SU USO**

<b>a- Medios p/pruebas bioquímicas</b>	Son aquellos que se utilizan para estudiar la acción de un <i>solo tipo de bacterias</i> frente a un determinado sustrato, poniendo de manifiesto ciertas propiedades bioquímicas de los microorganismos (investigación de la degradación de azúcares, metabolismo proteico, lipídico, etc), que junto a otras características o marcadores genéticos permiten su identificación. Ej.: Agar hierro triple azúcar (TSI), Agar citrato, Agar fenilalanina desaminasa, etc.
<b>b- Medios para estudios de sensibilidad a antimicrobianos</b>	Son aquellos en los que sus componentes no deben interferir con la actividad de los antimicrobianos y no deben incluir sustratos que las bacterias usen como vía metabólica alternativa a la vía inhibida. Ej. agar Mueller Hinton.
<b>c- Medios p/recuentos de bacterias</b>	Son sólidos o líquidos selectivos o no. Permiten conocer la cantidad de bacterias contenidas en materiales tales como agua, leche, carne, muestras clínicas, etc. Estos medios no son inhibidores y se utilizan para recuento total. Ej.: Agar para recuento en placa (PCA), caldo Mac Conkey, agar CLDE etc.
<b>d- Medios especiales</b>	Son aquellos cuya fórmula constitutiva cumple con las exigencias vitales de un determinado germen que sólo en ese medio halla las condiciones óptimas de desarrollo. Ej. Medio de Lowestein - Jensen para Micobacterias.
<b>e- Medios de transporte</b>	Son medios de cultivo especiales para transporte de materiales, líquidos o semisólidos cuya finalidad es mantener viables sin reproducción (o mínimamente) durante un tiempo a los microorganismos presentes, permitiendo con posterioridad recuperar incluso a los que están minoritariamente presentes. Son utilizados p/remisión de muestras al lab. Ej.: Medio de Stuart, Cary Blair.
<b>f- Medios de mantenimiento</b>	Son aquellos cuya composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que se siembran en él, permitiendo mantener su viabilidad en el laboratorio a fin de realizar diversos estudios. Aunque el método ideal para conservarlas es la liofilización, se pueden utilizar medios con glicerol o leche que se mantienen a bajas temperaturas. Ej.: caldo tripticasa-soya+glicerina.

## **Desarrollo práctico N° 7 MEDIOS DE CULTIVOS (2° PARTE)**

1- Se realizarán grupos de discusión, para lo cual cada grupo de trabajo investigará los medios de cultivo asignados por el instructor, buscando información acerca de:

- Composición del medio de cultivo
- Utilidad y usos
- Su clasificación de acuerdo con:
  - Estado físico
  - Naturaleza
  - Finalidad metabólica
  - Usos

2- Cada grupo de trabajo acondicionará los medios de cultivo preparados la clase anterior en tubos, de acuerdo con su posterior uso.

- Fundir y luego dejar solidificar inclinado para obtener un pico de flauta: tubos de agar nutritivo, agar fenilalanina, bilis esculina, agar citrato, manitol salado, etc
- Tubos de TSI: fundir el medio y dejar solidificar inclinado pero con la precaución de dejar 3 cm de base y luego un pico de 3 cm.

3- Cada grupo de trabajo preparará un medio de cultivo natural asignado por los docentes.

### **MATERIALES**

#### **Material de vidrio**

- Erlenmeyers, Probetas y Varillas de vidrio

#### **Otros materiales**

- Balanza analítica
- Papel para pesar y algodón
- Mechero y trípode
- Baño termostatzado y recipiente para Baño de María
- Papel, hilo y/o gomitas
- Tiras de pH
- Solución de NaOH 1 N y Solución de HCl 1 N
- Material bibliográfico para la discusión grupal

### **Anexo**

## **COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MÁS UTILIZADOS**

### **1. CALDO NUTRITIVO**

- |                     |         |
|---------------------|---------|
| • Cloruro de sodio  | 3 g     |
| • Extracto de carne | 3 g     |
| • Peptona           | 5 g     |
| • Agua destilada    | 1000 cc |



**2. AGAR NUTRITIVO**

- Extracto de carne        3 g
- Peptona                    5 g
- Agar                        12 a 15 g
- Agua destilada        1000 cc

**3. AGAR CLDE**

- Peptona                    4 g
- Tripteína                  4 g
- Extracto de carne        3 g
- L(-)Cisteína              0,128 g
- Lactosa                    10 g
- Azul de bromotimol      0,020 g
- Agar                        12 g
- Agua destilada        1.000 ml

**4. AGAR EMB SEGÚN LEVINE (Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa)**

- Peptona de Carne        10 g
- Lactosa                    10 g
- Fosfato dipotásico      2 g
- Eosina amarillenta      0,4 g
- Azul de Metileno        0,065 g
- Agar                        13,5 g
- Agua destilada        1.000 ml

**5. AGAR SANGRE**

- Medio base            100 ml
- Sangre entera        5-10%

El medio base a ser utilizado en la preparación de agar sangre y agar chocolate puede ser agar Columbia, agar tripteína soja o agar nutritivo.

La sangre se añade al agar estéril y enfriado a 45-50°C, evitando la formación de burbujas. Se prefiere la sangre de carnero, conejo y caballo, que ofrecen buenas reacciones hemolíticas. La sangre humana procedente de Banco tiene el inconveniente de contener citrato que puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, anticuerpos, agentes antimicrobianos y glucosa que falsea la reacción de hemólisis.

**PREPARACIÓN**

Puede realizarse de dos maneras:

**1. Directamente en placas de Petri:**

- a. Fundir el agar esterilizado en tubos (20 ml) a baño de María y dejar enfriar a 45-50°C.
  - Colocar 2 ml de sangre en una placa estéril y verter el agar en la misma; inmediatamente y con suavidad realizar movimientos circulares con la placa a fin de obtener una mezcla homogénea, cuidando de no mojar la tapa ni de hacer espuma.
  - Dejar solidificar.
  - Secar la superficie del medio en estufa a 37°C, 20 minutos (Placa invertida).

**2. En erlenmeyer:**

- a. Fundir el agar esterilizado en erlenmeyer a baño de María y dejar enfriar a 45-50°C.
  - Añadir 510 % de sangre y homogeneizar inmediatamente con suavidad para obtener una mezcla homogénea, evitando la formación de burbujas.
  - Distribuir en placas. Dejar solidificar y secar la superficie del medio en estufa a 37°C, 20 minutos (placa invertida).

## 6. AGAR CHOCOLATE

- Agar base 100 ml
- Sangre entera 5 - 10 %

### Preparación

Una vez fundido el agar base esterilizado, y enfriado a 45°C, agregar la cantidad de sangre necesaria y colocar en baño de agua. Elevar la temperatura a 80°C, mantener en estas condiciones durante 5 a 10 minutos hasta color típico agitando continuamente sin hacer burbujas. Enfriar a 45°C y distribuir en placas de Petri. Dejar solidificar y secar la superficie del medio en estufa a 37°C, 20 minutos (placa invertida).

*Nota: las placas de agar sangre y/o chocolate, de no usarse inmediatamente se conservarán en la heladera a temperatura de refrigeración.*

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

### 1. AGAR HARINA DE MAÍZ:

Se utiliza para la producción de pseudohifas y clamidosporas de especies de *Candidas*

- Harina de maíz 40 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1.000 ml

### PREPARACIÓN

- Mezclar la harina de maíz con 500 ml de agua y calentar a 65°C durante 1 hora. Homogeneizar periódicamente para evitar la aglomeración.
- Filtrar a través de una gasa y luego papel de filtro hasta obtener un filtrado claro.
- Reponer el agua evaporada y agregar el volumen restante de agua.
- Ajustar a pH 6,6-6,8.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 2. AGAR PAPA DEXTROSA: EMPLEADO PARA FAVORECER LA ESPORULACIÓN DE MOHOS

- Papas 250 g
- Glucosa 20 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1.000 ml

### PREPARACIÓN

- Lavar la papa (no pelar), cortar en pequeños trozos y colocar en erlenmeyer con 500 ml de agua. Calentar a baño de María 30 a 45 minutos.
- Al mismo tiempo, en otro erlenmeyer fundir agar en 500 ml de agua.
- Filtrar la papa a través de una gasa y agregar el filtrado al erlenmeyer con el agar fundido. Comprimir la gasa para escurrir el agua retenido en la pulpa de papa.
- Agregar la glucosa, mezclar y completar con agua al volumen total.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 3. AGAR PAPA-ZANAHORIA: SE UTILIZA PARA FACILITAR LA ESPORULACIÓN DE MOHOS

- Papa 20 g
- Zanahoria 20 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1.000 ml

### PREPARACIÓN

- Lavar la papa y la zanahoria (no pelar), cortar en pequeños trozos y colocar en erlenmeyer con 500 ml de agua. Calentar a baño de María 30 a 45 minutos.

- Filtrar la papa a través de algodón y luego con papel de filtro. Agregar el agar y ajustar el agua a 1.000 ml.
- pH 6,6 -6,8
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Koneman Elmer y col. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Bailey Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Jawetz E. y col. *Manual de Microbiología Médica*. Editorial El Manual Moderno S.A. 1979.
- Stainer R. y cols. *Microbiología*. Editorial Reverté. S. A. 1996.
- Lennette E. y cols. *Manual de Microbiología Clínica*. Editorial Panamericana. 1989.
- Ureña J. L. *Microbiología Oral*. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana de España, S. A. U. 2002.
- Álvarez M. V. y cols. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. Editorial. 1996.



## Trabajo Práctico N° 8

### SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

#### 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 o 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 introduce los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en bacteriología, que permiten 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 la integran, por lo tanto, 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 inoculación de un microorganismo en un medio nutritivo adecuado, para lograr su desarrollo y reproducción.

#### OBJETIVOS 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, en las siguientes situaciones:

- Cuando el medio original está agotado de nutrientes, una parte del desarrollo de este medio se pasa 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; por ej.: pruebas bioquímicas, sensibilidad a antimicrobianos, etc.

- Cuando se coloca una sola especie bacteriana en distintos medios adecuados; por ej.: medios para identificación, con la finalidad de que se reproduzca en ellos para observar su comportamiento, definir propiedades, etc.

### NORMAS GENERALES PARA LA INOCULACIÓN

- 1- Disponer de medios de cultivo adecuados y estériles.
- 2- Los medios de cultivo que van a inocularse deben estar atemperados y libres de agua de condensación; en algunos casos conviene mantenerlos en estufa a 35-37°C. En cualquier caso, las placas no deben estar fuera del refrigerador más de dos horas, para evitar la desecación de la superficie del medio.
- 3- Antes de comenzar la inoculación, colocar ordenadamente y a mano todos los medios y utensilios que se van a necesitar sobre una mesada limpia, desinfectada y protegida con papel de filtro (opcional). También es necesario disponer de recipientes adecuados donde depositar el material contaminado o desechable.
- 4- Efectuar todos los procedimientos microbiológicos en condiciones de asepsia y con utensilios perfectamente estériles. Manejar las muestras con precaución para evitar contaminaciones de las mismas o por causa personal; es aconsejable el uso de guantes en todo momento y de mascarilla. Evitar corrientes de aire durante el trabajo.
- 5- Trabajar siempre cerca de la llama del mechero para prevenir riesgos, sobre todo al abrir y cerrar los envases que contienen o reciben las muestras.
- 6- Establecer siempre la secuencia de los pasos a seguir en el procesamiento de la muestra con el fin de efectuar sin dificultades la inoculación.
- 7- Identificar las placas, tubos, portaobjetos y cualquier recipiente de la muestra, mediante una sigla y/o número que asegure su reconocimiento posterior. Las placas se rotulan en la base o parte inferior que contiene el medio; de otra manera, si se realiza en la tapa ésta puede extraíarse. Es conveniente colocarlas invertidas, ya que facilita su identificación y manejo.
- 8- Flamear el asa o instrumento utilizado en la siembra inmediatamente antes y después de su empleo, si el asa no es de material desechable. Evitar introducirlos calientes dentro de la muestra, porque se pueden formar aerosoles que originan contaminación ambiental y destrucción de los microorganismos por el intenso calor.
- 9- Flamear la boca de los recipientes después de abrirlos y antes de cerrarlos, con el fin de crear una atmósfera caliente que prevenga la contaminación; los tapones se toman con el dedo meñique de la mano derecha y nunca se dejan sobre la mesada. Mientras permanezcan abiertos, los recipientes se posicionan oblicuamente para impedir la entrada del polvo del aire.
- 10- Mantener las placas a la altura de la llama del mechero y a unos 20 cm de la misma, siempre que se abran para asegurar una atmósfera estéril. La posición oblicua de la placa es la adecuada para la inoculación.

### INSTRUMENTOS DE 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 asa ojal, hisopo o espátula de Drigalski.

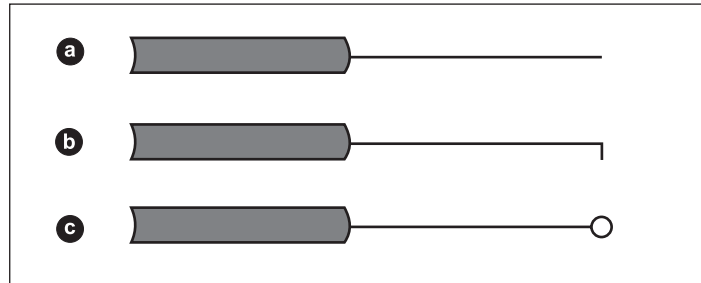
*Asa/Ansa.* Está confeccionada de un alambre de platino u otro material inserto en un mango para facilitar su manejo. Son más usadas las asas de nicrón, un material mucho más barato y resistente o las asas de plástico desechables y calibradas en diversas capacidades (1 µl, 5 µl, 10 µl). Existen distintos tipos de ansas que se utilizan en función del procedimiento microbiológico que se requiera realizar (Fig. 8.1):

**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 por picadura de medios sólidos y semisólidos en tubos.

**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.

FIGURA 8.1: ASA/ANSAS EMPLEADAS EN LA SIEMBRA DE MICROORGANISMOS. a) RECTA, b) EN L, c) OJAL



**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 éstas a partir de suspensiones de colonias aisladas.

**Jeringas.** 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 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 recuento de hongos y levaduras.

#### TÉCNICAS DE SIEMBRA

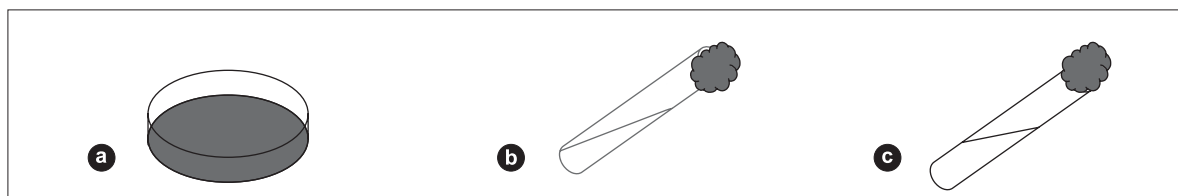
Los métodos básicos, para la siembra de gérmenes aerobios o anaerobios, se fundamentan en los mismos principios, pero varían según el estado físico de los medios de cultivo:

- 1- Sólido
- 2- Semisólido
- 3- Líquido

**1. Siembra en medio sólido.** El medio sólido lo podemos tener en placas de Petri o en tubo de ensayo como agar inclinado o semiinclinado en pico de flauta (Fig. 8.2).

FIGURA 8.2:

a). Placa de Petri con medio de cultivo, b). Tubo de agar inclinado; c). Tubo con agar semiinclinado en pico de flauta.



En *medios sólidos en placa de Petri* las dos técnicas de siembra más utilizadas son:

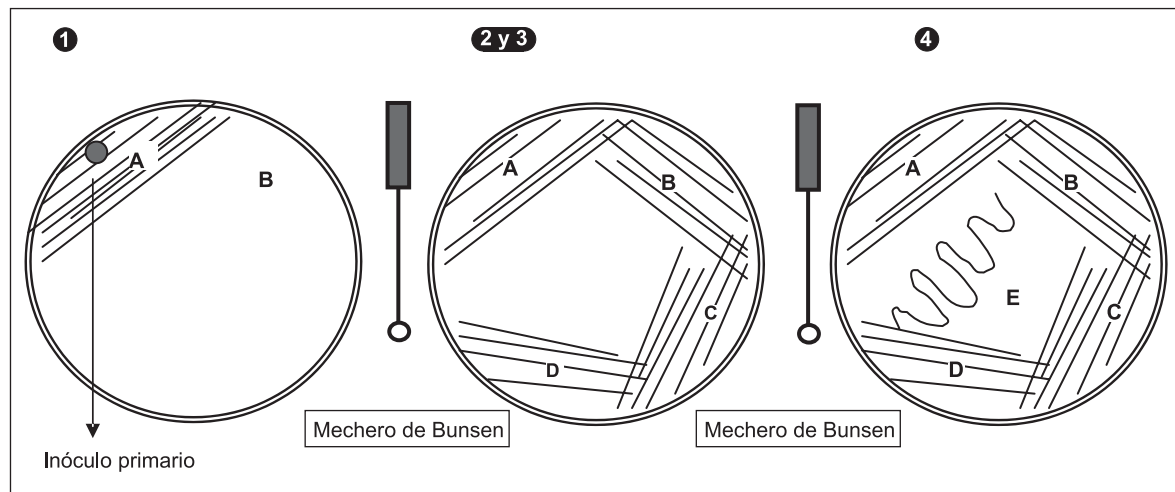
- Agotamiento en estría. (Fig. 8.3)
- Método de diseminación en superficie. (Fig. 8.5)

**Agotamiento en estría:** se practica para obtener cultivos puros de muestras que contienen flora polimicrobiana; es también útil para estudiar la morfología y propiedades hemolíticas de las colonias aisladas. Los pasos a seguir son:

Tomar una porción de la muestra con el anillo del ansa, pipeta o hisopo y depositar directamente sobre la superficie solidificada del medio en un extremo. Una vez hecho el inóculo primario diseminar el material en la placa empleando un ansa ojal. Para ello, 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, realizar estrías muy juntas con el ansa, pero sin hacer presión para no dañar el agar, en una parte de la placa equivalente a un cuarto (Fig. 8.3. zona A). Se flamea el asa, se enfría y se toca tres a cinco veces la siembra anterior. Se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite en los dos cuadrantes restantes y finalmente se termina con un estriado en zig-zag. Terminada la siembra, tapar las placas. Incubar.

**FIGURA 8.3. 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 última 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).



El método descrito es el recomendado para el primocultivo de casi todas las muestras.

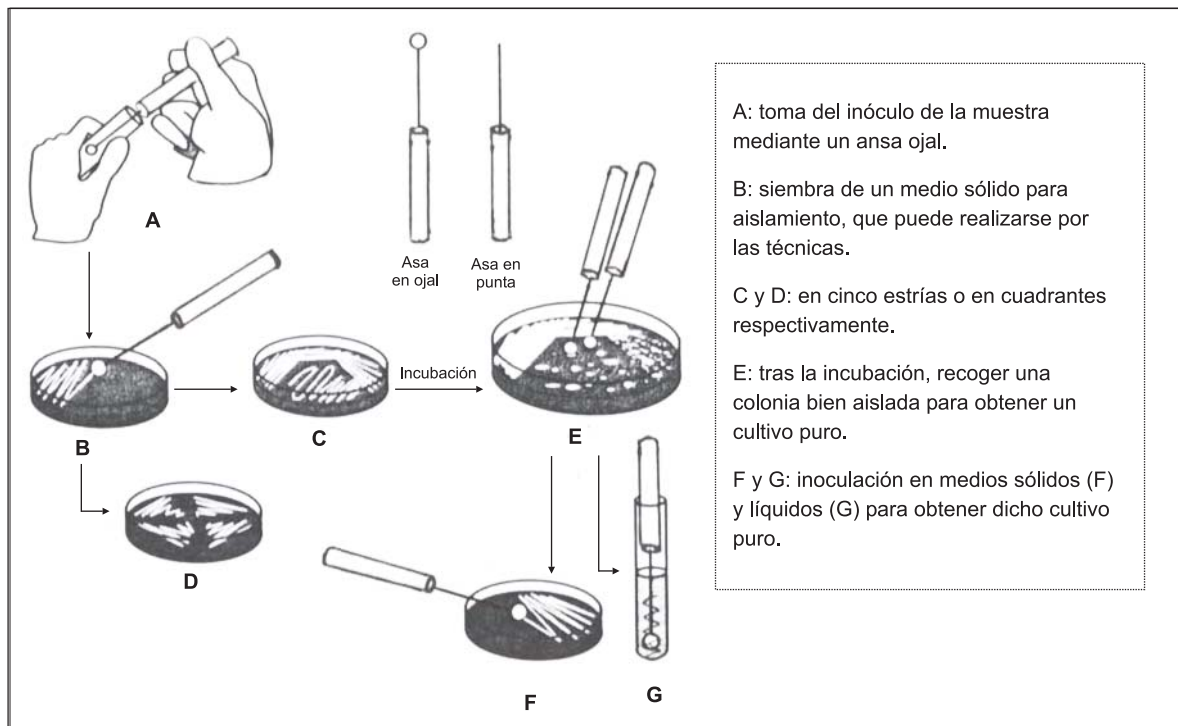
El *propósito* de esta técnica es diluir suficientemente el inóculo sobre la superficie del agar para obtener colonias bacterianas bien aisladas a partir de unidades formadoras de colonias.

Las colonias aisladas obtenidas por el método de agotamiento en estría se pueden luego subcultivar individualmente transfiriéndolas a otros medios, a fin de obtener cultivos puros que pueden ser estudiados en medios diferenciales (Fig. 8.4).

Existen otros métodos especiales de inoculación: dilución y agotamiento, siembra en profundidad, siembra por goteo, etc.



FIGURA 8.4. OBTENCIÓN DE UN CULTIVO MICROBIANO PURO A PARTIR DE UNA MUESTRA CLÍNICA



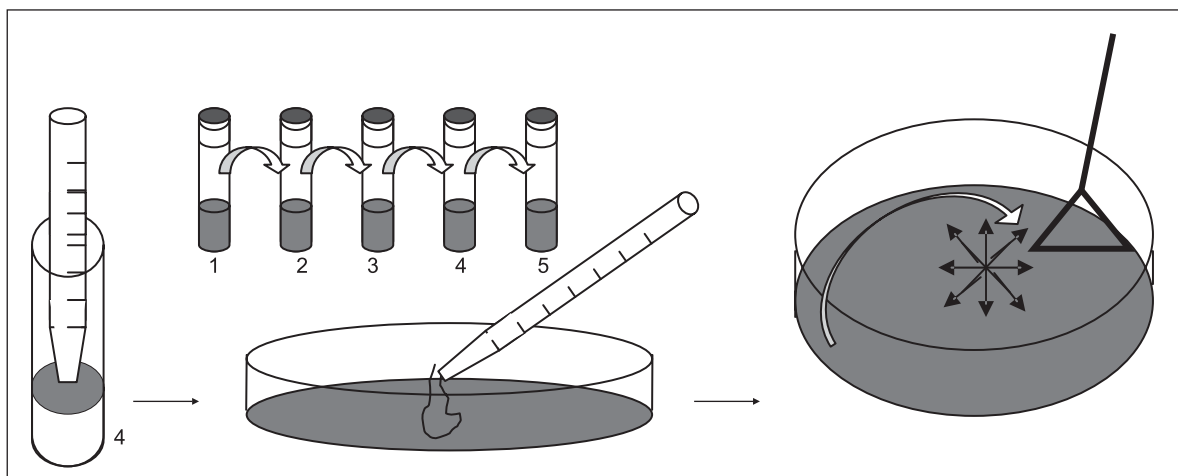
**Diseminación en superficie:** consiste en distribuir la muestra de manera uniforme sobre la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Se utiliza para ello la espátula de Drigalsky, hisopo o asa ojal.

Cuando se utiliza una espátula de Drigalsky (Fig. 8.5) se coloca el inóculo primario con una pipeta graduada o micropipeta en el centro de la placa y luego se disemina el inóculo en la superficie del medio sólido, mediante:

- 20 movimientos concéntricos, girando la placa en el sentido de las agujas del reloj;
- movimientos de vaivén que cubran toda la placa.

Las espátulas de Drigalsky se disponen en un vaso de precipitado conteniendo etanol y se esterilizan por flameado.

FIGURA 8.5: MÉTODO DE DISEMINACIÓN EN SUPERFICIE CON ESPÁTULA

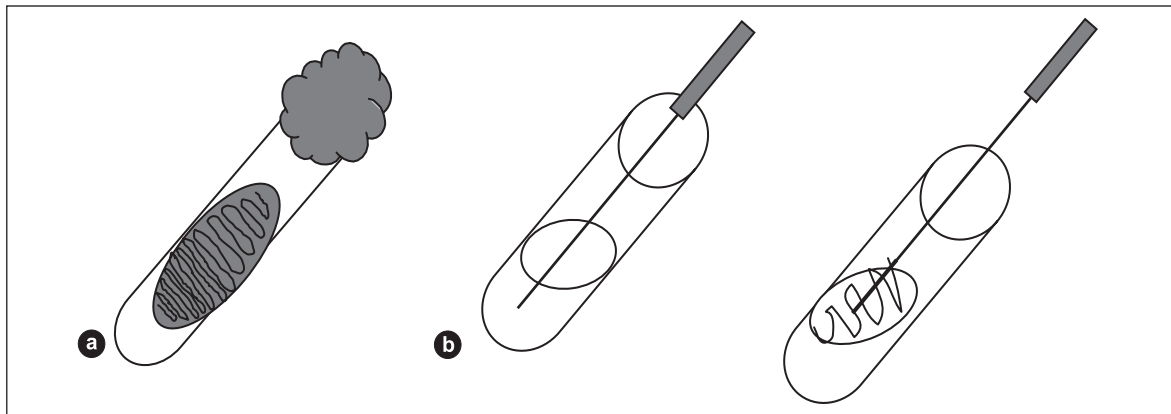


Es el método adecuado para el recuento de colonias y para la realización del antibiograma por el método de difusión (utilizando ansas calibradas y espátula de Drigalsky).

Los **medios sólidos en tubo** se utilizan para la transferencia de cultivos puros y estudios bioquímicos. El medio puede estar dispuesto en forma inclinada hasta unos 45°, o semi-inclinados (pico de flauta).

En tubo inclinado se coloca el inóculo en el fondo del tubo y se comienza a estriar por la base del tubo, sembrando en “S” en la superficie inclinada (Fig. 8.6.a). En el caso de medios sólidos en tubos semi-inclinados se inocula primero atravesando el agar en profundidad, y luego de retirar el alambre de la parte profunda se continúa en “S” en la superficie (Fig. 8.6.b).

**FIGURA 8.6: MÉTODO DEL AGOTAMIENTO EN ESTRÍA**  
a: en tubo inclinado. b: en tubos semi-inclinados.



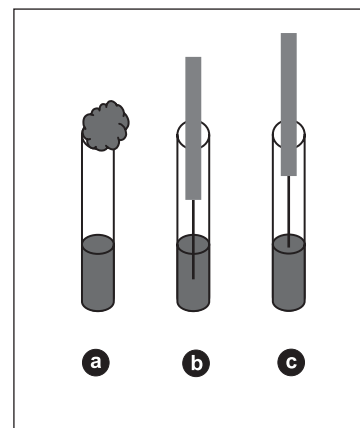
**2. Siembra en medio semisólido.** Se utiliza el método de la *picadura o punción*. Es útil fundamentalmente para dos fines:

- observación de movilidad 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 verticalmente (Fig. 8.7.a). Se realiza una punción central y vertical con el ansa cargada con el inóculo (Fig. 8.7.b), cuidando de retirarla por la misma perforación practicada al penetrar al medio con ella (Fig. 8.7.c). Cuando se inoculan tubos con agar semisólido para pruebas de movilidad es importante que el alambre se retire siguiendo el mismo trayecto utilizado para atravesar el medio. Un movimiento en abanico 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. La movilidad se observa con un desarrollo microbiano en todo el medio o en parte de él, lo que indica que los gérmenes sembrados son móviles. Caso contrario, el desarrollo es solamente en el lugar de siembra o picadura.

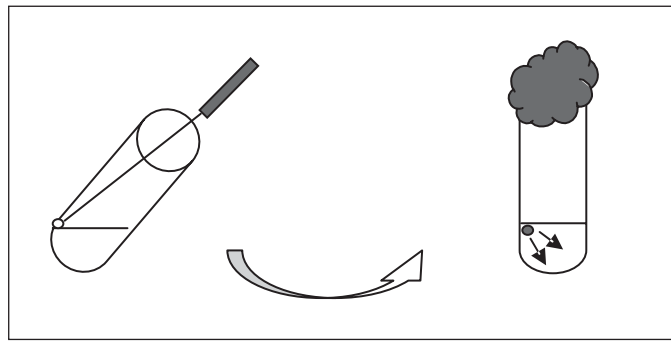
**FIGURA 8.7. SIEMBRA EN MEDIO SEMISÓLIDO**



**3. Siembra en medio líquido.** Los medios de cultivo a inocular líquidos o caldos, están SIEMPRE distribuidos en tubos, o Erlenmeyer. El cultivo de procedencia puede encontrarse en placa de Petri, en tubo (caldo), o en pico de flauta.

Si se desea transferir colonias desarrolladas en medio sólido, ya sea en placa o en tubos, se toca el cultivo con ansa aguja u ojal, extrayendo una parte del mismo en las condiciones de esterilidad ya estudiadas. Luego se quita el tapón del tubo a inocular y se procede como se ilustra en la Fig. 8.8.

FIGURA 8.8. SIEMBRA EN MEDIO LÍQUIDO



Inclinar el tubo a un ángulo de aproximadamente  $30^\circ$  y acercar el 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. Realizar movimientos sobre el vidrio para disgregar el cultivo. Cuando el tubo de cultivo se vuelve a la posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie.

También se puede partir del desarrollo en medio líquido. En este caso, quitar el tapón de algodón con el dedo meñique de la mano derecha, tomando el tubo con el cultivo en la mano izquierda, elevando el mismo hacia la llama del mechero, para flamear su boca, tratando de mantenerlo inclinado. Introducir el asa previamente esterilizada, en el tubo, y tomar la muestra sumergiendo el asa en el cultivo. Se siembra a un medio de cultivo líquido, introduciendo la aguja o anillo cargada y agitando luego con la misma dentro del tubo para producir homogeneización de la carga microbiana aplicada, y desprendimiento total de los gérmenes del asa. Posteriormente tapar el tubo y llevar a incubar.

#### INCUBACIÓN DE MEDIOS INOCULADOS

**Acondicionamiento para la incubación:** las placas sembradas se apilan invertidas y siempre se manejan en esta posición para el caso de cultivos bacterianos y con la tapa hacia arriba en cultivos fúngicos. Los tubos sembrados se incuban en posición vertical.

**Temperatura:** después de la inoculación, los medios deben incubarse a temperatura óptima lo más pronto posible, pues el retraso limita la capacidad de crecimiento de algunos microorganismos delicados y favorece el desarrollo de contaminantes, sobre todo en los cultivos líquidos.

La temperatura óptima de incubación para la mayoría de los patógenos humanos está próxima a la corporal ( $35-37^\circ\text{C}$ ). Solo en ocasiones se incuban los cultivos a temperaturas más elevadas con el fin de seleccionar algún patógeno, o a menor temperatura para lograr el aislamiento de los que no toleran los  $37^\circ\text{C}$ . Determinadas levaduras y los hongos filamentosos crecen mejor a  $28-30^\circ\text{C}$ .

Es importante que la temperatura de incubación se mantenga en los límites establecidos durante todo el proceso.

**Atmósfera de incubación:** dependiendo de los requerimientos de oxígeno, la incubación se realiza en atmósfera ambiente, microaerófila o anaerobia.

**Incubación en atmósfera con  $\text{CO}_2$ :** las bacterias que precisan una tensión de  $\text{CO}_2$  para desarrollarse son las llamadas capnófilas. Esta atmósfera, del 5-10% se consigue incubando en recipientes de cierre hermético con una vela encendida en su interior (método de extinción de la llama): la llama consume parte de  $\text{O}_2$  existente y lo sustituye por  $\text{CO}_2$ . Como norma general, los medios con sangre o hemoderivados se incuban en atmósfera con  $\text{CO}_2$  pues en ellos se investiga cualquier tipo de microorganismos.

**Incubación en atmósfera microaerófila:** la atmósfera debe contener una concentración de  $\text{O}_2$  baja (5-7%), una tensión de  $\text{CO}_2$  próxima al 10% y un 80% de nitrógeno. Esta atmósfera puede conseguirse utilizando una campana de anaerobiosis sin catalizador, pero existen comercializados sobres Gaspar que generan la atmósfera conveniente. La incubación de estos cultivos se mantiene como mínimo hasta 48 horas.

**Incubación en condiciones anaerobias:** esta atmósfera se logra mediante el sistema Gaspar que utiliza una campana de vidrio o plástico con cierre hermético. La incubación se prolonga hasta 48 horas como mínimo, por la lentitud de crecimiento de muchas bacterias anaerobias.

**Tiempo de incubación:** los cultivos se examinan después de 18-24 horas de incubación, algunas bacterias necesitan incubación adicional para desarrollarse bien y han de mantenerse hasta 48 ó 72 horas. En casos especiales, en relación con el tipo de muestra o el microorganismo que se investiga, la incubación se prolonga por más tiempo: 7 días para el hemocultivo, 15 días para hongos dermatofitos, 30 o más para las micobacterias, etc.

### INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

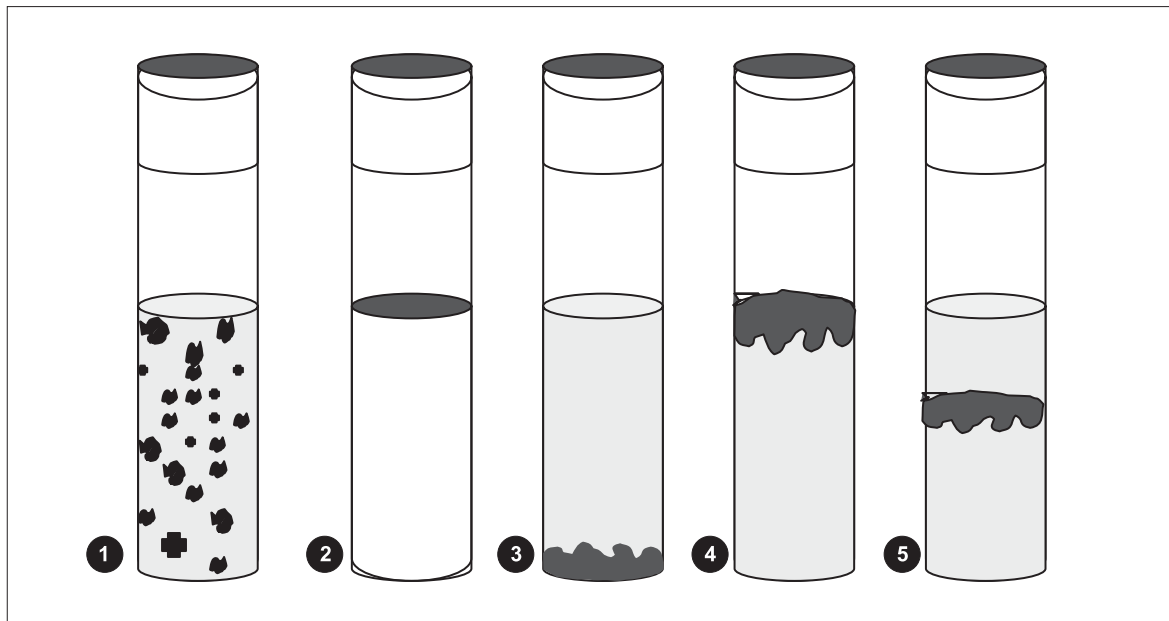
La interpretación de los cultivos primarios luego de 24-48 horas de incubación requiere una considerable destreza. El microbiólogo debe evaluar si hubo desarrollo microbiano en medios líquidos o sólidos y decidir si se requieren procedimientos adicionales.

**Evaluación de medios líquidos.** Los tubos que contienen medios primarios no se utilizan comúnmente para evaluar la morfología de las colonias, sino más bien para enriquecer el desarrollo de las bacterias de modo que se puedan aislar en cantidad suficiente para su estudio.

El desarrollo microbiano en medios líquidos se visualiza mediante: presencia de grumos, turbidez, depósito en el fondo o como un velo superficial o intermedio. (Fig. 8.9.).

**FIGURA 8.9. DESARROLLO MICROBIANO EN MEDIO LÍQUIDO**

1. Presencia de grumos, 2. Turbidez, 3. Depósito en el fondo, 4. Velo superficial, 5. Velo intermedio



**Evaluación en medios sólidos.** Se efectúa mediante un examen macro y microscópico:

1. Observando las características macroscópicas y cantidad relativa de cada tipo de colonia aislada en agar.

2. Observando los cambios en el medio que rodea a 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.** La evaluación de las características macroscópicas de las colonias se realiza habitualmente 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 estu-

diar 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.

**CUADRO 8.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS USADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS**

1. Tamaño	2. Forma	3. Elevación	4. Borde
Diámetro en mm	Puntiforme 	Plana 	Entero 
	Circular 	Elevada 	Ondulado 
	Filamentosa 	Convexa 	Lobulado 
	Irregular 	Monticular 	Aserrado 
	Rizoide 	Umbeliforme 	Filamentosa 
	Fusiforme 	Umbilicada 	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.

9. 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 8.2

**CUADRO 8.2. REACCIONES EN MEDIO DE AGAR UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.**

<b>1. Hemólisis en agar sangre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Alfa:</b> halo de hemólisis parcial de glóbulos rojos alrededor de las colonias con coloración verde del medio.</li> <li>- <b>Beta:</b> halo de hemólisis total de glóbulos rojos alrededor de las colonias, debido a la lisis de los glóbulos rojos.</li> <li>- <b>Gamma:</b> no hay hemólisis de glóbulos rojos ni cambio en el medio que rodea la colonia.</li> </ul>
<b>2. Producción de pigmentos en medio de agar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pigmentos hidrosolubles que colorean el medio.</li> <li>- Píocianina.</li> <li>- Pigmentos fluorocrómicos.</li> <li>- Pigmentos no difusibles confinados a las colonias.</li> </ul>
<b>3. Cambios en medios diferenciales</b>	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.

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 después con la coloración de Gram.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Koneman Elmer y cols. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Bailey Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Jawetz E. y cols. *Manual de Microbiología Médica*. Editorial El Manual Moderno S.A. 1979.
- Stainer R. y cols. *Microbiología*. Editorial Reverté. S. A. 1996.
- Lennette E. y cols. *Manual de Microbiología Clínica*. Editorial Panamericana. 1989.
- Merck. *Manual de medios de cultivo Merck*. Química Argentina. 1990.
- P. García Martos y cols. *Microbiología Clínica Aplicada*. 3ª Edición. 1996. Editorial Díaz de Santos, S. A.

## Desarrollo Práctico N° 8

### SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Los grupos de trabajo realizarán de acuerdo con las instrucciones del docente lo siguiente:

#### ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1- Fundir los medios de cultivo sólidos, preparados en prácticos anteriores, a baño de María. Una vez fundidos dejar enfriar aproximadamente a 50-60°C; a esta temperatura es posible tomar el Erlenmeyer sin quemarse y disminuye la formación de gotas de condensación en la tapa de las placas.

2- Distribuir en placas y tubos estériles, a razón de 20 ml por placa y 3 ml por tubo en condiciones de esterilidad.

3- Dejar solidificar sobre la mesada, las placas en posición horizontal y los tubos inclinados o en pico de flauta.

4- Una vez solidificado el medio de cultivo llevar las placas a la estufa a 37°C por aproximadamente 15 minutos, para secar el agua de condensación que pudiera haberse formado.

#### PREPARACIÓN DE AGAR SANGRE Y CHOCOLATE

Para la preparación de agar sangre y chocolate se seguirá el procedimiento detallado en el Anexo del Trabajo Práctico N° 7. Luego seguir los pasos 2-3 y 4 del punto anterior.

#### SIEMBRA

1- Siembra de muestras para aislamiento, en placas, en distintos medios de cultivo empleando diferentes técnicas.

2- Siembra del material en estudio en caldo, agar semi-sólido y en pico de flauta.

3- Los cultivos bacterianos se incuban a 35-37°C, durante 18-24 horas, en posición invertida. Las placas de agar sangre y chocolate se incubarán en atmósfera con CO<sub>2</sub>, método de extinción de la llama.

4- Los cultivos fúngicos se incuban a 25-28°C durante cinco a siete días, con la tapa hacia arriba.

#### LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

1- Descripción de las características macroscópicas de las colonias de cultivos bacterianos y fúngicos.

2- Coloración de Gram y morfología celular de los cultivos bacterianos.

3- Repique de la/s colonia/s aisladas a agar nutritivo en pico de flauta, para continuar con las pruebas de identificación.

#### MATERIALES

- Placas y tubos estériles
- Medios de cultivo preparados
- Sangre
- Mechero y trípode
- Recipiente para baño de María
- Ansa: aguja, ojal y en L
- Espátula de Drigaslky
- Hisopos
- Recipiente para el material de descarte
- Muestras
- Recipiente para la atmósfera con CO<sub>2</sub>
- Vela
- Estufa de cultivo a 37°C





## Trabajo Práctico N° 9

### IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS. IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

#### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico, manejo y tratamiento de las enfermedades infecciosas depende fundamentalmente de la correcta identificación del agente causal.

Los avances de la biología molecular aplicados al estudio taxonómico posibilitan hoy una clasificación exhaustiva de las bacterias.

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.

Actualmente existen numerosos equipos comerciales para la identificación de las bacterias.

Por otra parte, en ciertas ocasiones es necesario apelar a la caracterización genética para la identificación definitiva de un aislamiento.

Este Práctico tiene por objeto brindar esquemas sencillos, destinados a la identificación fenotípica de las especies aisladas más frecuentemente, de las infecciones en el humano. Se han seleccionado pruebas reproducibles, de modo de reducir al mínimo el margen de error. Sin embargo, la identificación definitiva de ciertas especies puede demandar un número considerable de pruebas, lo que determinaría su derivación a centros microbiológicos más complejos.

Se pueden observar en el Cuadro 9.1 las pruebas que se deben realizar para la identificación de bacilos Gram negativo aerobios.

**CUADRO 9.1. PRUEBAS MÍNIMAS PARA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS**

Prueba de la Oxidasa Utilización de la Glucosa en Agar Triple Azúcar (Tsi)	
Fermentadores Ej.: <i>Enterobacteriaceae</i>	No Fermentadores Ej.: <i>Pseudomonas</i> , otros bacilos Gram negativos
Pruebas de identificación	Pruebas de identificación
• Producción del Indol (I)	Producción de pigmentos
• Reacción del Rojo de metilo (RM)	Movilidad
• Producción de acetilmetilcarbinol Prueba de Voges Proskauer (VP)	Fluorescencia
• Utilización de citrato (CIT)	Producción del Indol
Gas	Decarboxilasas
Sulfuro de hidrógeno	Oxidación-Fermentación de Hugh y Leifson (OF)
Actividad de la $\beta$ -galactosidasa (ONPG)	Producción de desoxirribonucleasa (DNAsa)
Movilidad	Crecimiento en agar Mac Conkey
Lisina decarboxilasa	Producción de ureasa en medio de Christensen
Ornitina decarboxilasa	Reducción de nitratos a nitritos
Arginina-deshidrolasa	Desnitrificación ( $\text{NO}_2$ a $\text{N}_2$ )
Producción de fenilalanina desaminasa	Desarrollo a 42°C
Producción de ureasa	Desarrollo en caldo con CINa al 6,5%

• Reacciones IMVIC. Estas siglas comprenden las pruebas del I, RM, VP, CIT. Actualmente se consideran las pruebas en forma independiente en los esquemas de identificación.

### **IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS (BACIOS GRAM NEGATIVOS, FERMENTADORES, OXIDASA NEGATIVA)**

Existen actualmente más de 80 especies de enterobacterias descritas como aislamientos de materiales clínicos. Sin embargo, el 95% de los mismos corresponden a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia marcescens* y *Proteus* spp.

A continuación se describen algunas pruebas, remitiéndose al alumno al uso de la bibliografía complementaria que figura en esta Guía, como así también la que figura en el programa vigente, para completar el tema de trabajos prácticos.

En todas las pruebas usadas para la identificación de enterobacterias es menester ensayar cada nueva partida de medios o reactivos con organismos que den reacciones positivas y negativas sugeridos en la bibliografía.

### **PRUEBA DE LA OXIDASA**

Está basada en la detección de la presencia o ausencia de la producción de la enzima citocromooxidasa. Esta reacción se debe a la presencia -en la cadena respiratoria- de un sistema citocromo 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 con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de oxidasa es importante para identificar a aquellos organismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba es sumamente útil para el “*screening*” de colonias sospechosas de ser enterobacterias (todas negativas), y para la identificación de colonias que se presume sean *Pseudomonas* o *Neisseria* (positivas).

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

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

**La técnica directa en placa**, en la cual se añaden directamente dos o tres gotas del reactivo a las colonias bacterianas aisladas que se desarrollan en placas.

**La 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 asa o aguja de inoculación de platino para retirar las colonias, ya que la presencia de un simple vestigio de hierro puede por sí solo catalizar la oxidación del reactivo, dando una reacción falsamente positiva.

### **INTERPRETACIÓN**

Oxidasa (+) = color rosado, después marrón y finalmente negro.

Oxidasa (-) = no se produce cambio de color.

Se recomienda el derivado tetrametilico de la p-fenilendiamina ya que es más sensible, menos tóxico, y más estable que el derivado dimetilico.

### **CONTROLES**

Se deben incluir en las pruebas, a intervalos frecuentes, controles constituidos por especies bacterianas que exhiban reacciones positivas y negativas.

Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa*

Control negativo: *Escherichia coli*

### **DETECCIÓN DE FERMENTADORES DE GLUCOSA Y LACTOSA EN AGAR HIERRO DE KLIGER (KIA) O EN AGAR TRIPLE AZÚCAR (TSI)**

Estas pruebas se usan para orientar en la identificación inicial de los bacilos Gram (-), en especial de los miembros de la familia de Enterobacteriaceae. Un KIA o TSI negativo nos indica

que un organismo no pertenece a dicha familia y que se debe determinar una serie diferente de características a fin de lograr la identificación de la especie.

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

- determinación de las fermentaciones de glucosa, lactosa y/o sacarosa con producción de ácidos y gases ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ );
- 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 AHK contiene dos hidratos de carbono: lactosa al 1% y glucosa al 0,1%. La diferencia entre AHK y TSI radica en que el TSI contiene 1% de sacarosa (además de glucosa y lactosa).

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 AHK y TSI y otros medios, por ej.: el SIM, medio semisólido que también detecta sulfuro.

Debemos recordar que el medio contiene tiosulfato de sodio para la producción del sulfhídrico. 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 dará como resultado un cambio visible de color a amarillo (pH menor a 6,8) y rojo (pH 7,4). El medio no inoculado tiene un color anaranjado rojizo.

*Muchos microbiólogos prefieren el TSI al KIA debido a que el agregado de sacarosa a la fórmula ayuda a investigar la presencia de Salmonella y Shigella, ya que ninguna de estas (salvo raras cepas) utiliza lactosa o sacarosa (cualquier reacción ácido/ácido indica fermentación de lactosa y/o sacarosa).*

**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 tres 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 AHK y TSI atravesando el medio hasta la parte profunda del tubo. Es importante no extender la línea de siembra a más de tres a cinco mm del fondo del tubo para evitar la entrada de aire en la parte profunda y alterar la anaerobiosis del fondo. 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 horas.

**INTERPRETACIÓN**

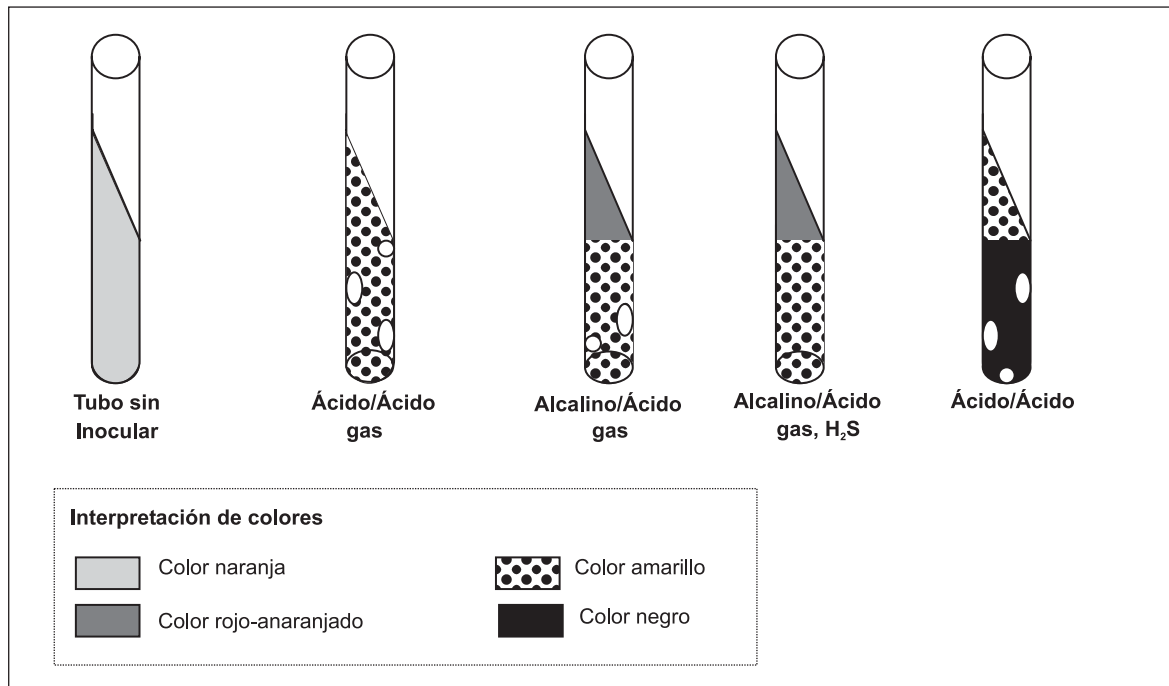
- Utilización del hidrato de carbono

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

**CUADRO 9.2. REACCIONES EN EL KIA**

PICO DE FLAUTA	CAPA PROFUNDA	HIDRATO DE CARBONO METABOLIZADO
Alcalino	Ácido	Glucosa
Ácido	Ácido	Glucosa y Lactosa
Alcalino	Alcalino	No hay fermentación de Glucosa ni Lactosa. Utilizan peptonas del medio de cultivo.
Alcalino	Sin cambio	No hay fermentación de Glucosa ni Lactosa. Utilizan peptonas del medio de cultivo.

**FIGURA 9.1. OBSERVACIÓN DE RESULTADOS TÍPICOS EN TUBOS DE TSI**



**PRECAUCIONES**

Es fundamental leer e interpretar un tubo de AHK (TSI) dentro del período de incubación de 18 a 24 horas. Si se lee antes, por ejemplo a las 12 horas, puede obtenerse un resultado falso ácido/ácido, debido a que la glucosa aún no se ha degradado completamente. Erróneamente se interpretaría como que el microorganismo fermenta glucosa y lactosa y/o sacarosa. Por otra parte, un tubo de AHK leído después de 24 horas puede dar un falso 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.

**FERMENTACIÓN DE GLUCOSA SOLAMENTE**

Esta reacción (alcalina/ácida) se da en los microorganismos capaces de fermentar solamente la glucosa; no son fermentadores de lactosa y/o sacarosa en el TSI. En este caso sólo puede obtener una cantidad relativamente pequeña de ácido, ya que la concentración de glucosa del medio es de solo 0,1%. Inicialmente, durante las primeras 8 a 12 horas de incubación, aún esta cantidad es suficiente para virar a color amarillo tanto el fondo como el pico. Sin embargo, en las pocas horas siguientes, las proteínas de la parte inclinada del tubo, por acción del oxígeno y las bacterias, comienzan a liberar aminas que contrarrestan las pequeñas cantidades de ácido. A las 18-24 horas, todo el pico retorna a un pH alcalino, retomando un color rojo. En el fondo del tubo, empero, la degradación proteica es insuficiente para contrarrestar el ácido formado, debido a la degradación anaeróbica de la glucosa, y se mantiene el color amarillo debido a los productos terminales ácidos que se forman.

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

**FERMENTACIÓN DE LACTOSA Y GLUCOSA**

Esta reacción (ácida/ácida) se da en los microorganismos que fermentan tanto la lactosa (y/o sacarosa en el TSI) como la glucosa en busca de elementos nutritivos energéticos, dando después de la 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 horas, aún no se ha consumido y existe una condición ácida tanto en el pico como en el fondo debido a la fermentación de la glucosa. Si se lee el mismo tubo después de 48 horas, el pico de flauta se vuelve alcalino por deplección de la lactosa y la utiliza-

ción de las peptonas. Ejemplo de bacterias que fermenten glucosa y lactosa son los coliformes como *Escherichia coli* y el grupo *Klebsiella-Enterobacter*.

**NO-FERMENTACIÓN DE LACTOSA NI DE GLUCOSA**

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).

- **Producción de gases** (CO<sub>2</sub> + H<sup>2</sup>)

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.

- **Producción de sulfhídrico**, que ennegrece el medio y a veces oculta la acidez de la capa profunda del medio que, aunque no se la observe, existe cuando se produce sulfhídrico.

**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:

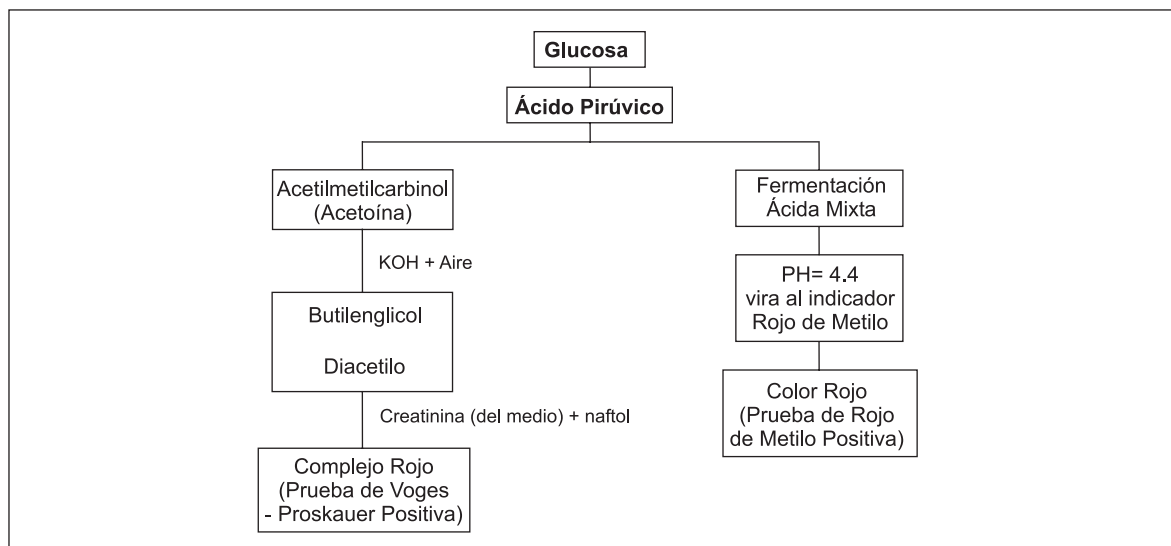
- La fermentación ácida mixta.
- Butilenglicol.

La prueba de rojo de metilo (RM) sirve para identificar especies bacterianas que son grandes productoras 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 estabilizador 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**

Se siembra el caldo RM/VP con un cultivo puro del microorganismo en estudio, se incuba a 35°C durante 48 horas (no menos) y hasta cinco días. Finalizado este período se divide en 2 fracciones: una de ellas (A) para la prueba de RM, y la otra (B) para el VP.

A la fracción (A) se le añaden dos a cinco gotas del indicador rojo de metilo. 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.

Color amarillo indica que la reacción es negativa.

#### **PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER**

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

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

1. 0,6 ml. de alfa-naftol al 5%.
2. 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**

Sirve para identificar 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 (NO<sub>4</sub>OH) alcalinizando el medio.

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

#### **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.

#### **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 tomando 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.

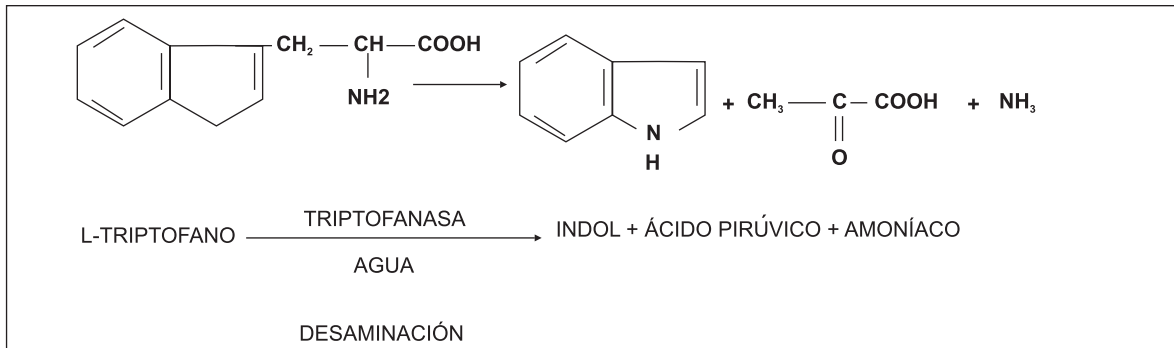
Luego de incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas (hasta 4 días), el desarrollo bacteriano y el color azul intenso indican que la prueba es positiva y revela que el microorganismo ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con la formación de productos alcalinos.

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. El medio no inoculado es de color verde.



**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 horas.

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.

**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 ( $\text{S}=\text{del metal pesado}$ ) 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 horas. 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.

**PRUEBA DE LA MOVILIDAD**

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

**PROCEDIMIENTO**

Se usan medios semisólidos para detectar la movilidad, que contienen agar al 0,4% o menos. Se emplea el medio SIM (sulfuro-indol-movilidad) que puede medir más de una característica en un mismo tubo. Se debe interpretar primero la prueba de movilidad, ya que el agregado del reactivo del indol puede oscurecer los resultados.

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 horas 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.

**PRUEBA DE LA FENILALANINA DESAMINASA**

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

**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 horas. Se agregan cuatro o cinco 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 horas 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.

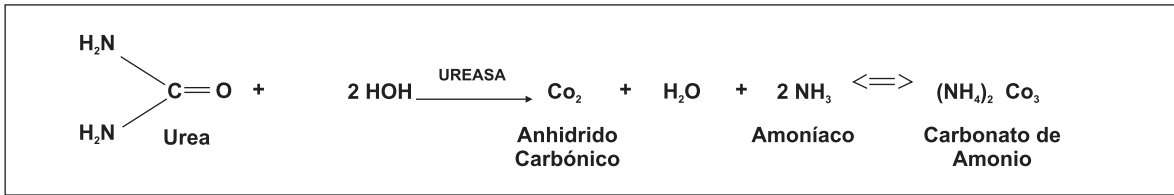
**PROCEDIMIENTO**

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 comunmente.

Incubar ambos medios a 35°C durante 18 a 24 horas. 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.



**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 una campanita o 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.

**TABLA 9.1. PRUEBAS MÍNIMAS DE IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS**

Género	TSI	Gas	SH <sub>2</sub>	RM	VP	Indol	Movil	Cit	FA	Urea	Lis	Arg	Orn
<i>Escherichia</i>	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	v	v
<i>Shigella</i>	K/A	-	+	-	-	v	-	-	-	-	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	K/A	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Salmonella</i>	K/A	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	v	+
<i>Citrobacter</i>	A/A K/A	+	v	+	-	v	+	+	-	v	-	v	v
<i>Klebsiella</i>	A/A	++	-	-	+	v	-	+	-	+	+	-	-
<i>Enterobacter</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	+	-	v	-	+	+
<i>Hafnia</i>	K/A	+	-	v	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>Pantoea</i>	A/A K/A	v	-	v	v	v	+	v	v	v	-	-	+
<i>Serratia</i>	K/A	+	-	v	+	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Proteus</i>	K/A	v	+	+	v	v	+	v	+	++	-	-	+
<i>Morganella</i>	K/A	+	-	+	-	+	+	-	+	++	-	-	+
<i>Providencia</i>	K/A	v	-	+	-	+	v	+	+	v	-	-	-
<i>Yersinia</i>	K/A	-	-	+	-	v	-*	-	-	v	-	-	+

**TSI:** Agar Hierro Triple Azúcar, **RM:** Rojo de Metilo, **VP:** Voges-Proskauer, **I:** Indol, **Cit:** Citrato, **FA:** Fenilalanina, **Mov:**

Movilidad, **Lis:** Lisina, **Arg:** Arginina, **Orn:** Ornitina, **A:** ácido, **K:** Alcalina, **+**: 90% o más positivas, **-:** 90% o más negativas,

**v:** variable. Las zonas sombreadas indican las reacciones claves. \*No móviles a 35°-37°C, móviles a 22°C. (Esquema

adaptado de Koneman, Stephen, Allen, Janda, Schreckenber, Winn. Diagnostic Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. Ed. Lippincillt. 1997).

**IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES (BNF)**

Son bacilos Gram negativos aerobios, que no utilizan los hidratos de carbono como fuente de energía o que los degradan por la “vía oxidativa” más bien que por la vía fermentativa.

Es frecuente el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros.

## Desarrollo Práctico N° 9

### IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVA

El alumno, mediante pruebas bioquímicas, identificará familia y género al que pertenecen las colonias desarrolladas de una siembra efectuada 24 horas antes.

#### MATERIALES

1. Picos de agar nutritivo con cultivos de bacilos Gram negativos.
2. Medios de cultivo preparados para las pruebas bioquímicas y fraccionados convenientemente.
  - Agar citrato de Simmons
  - Agar fenilalanina
  - Agar urea, SIM, TSI
  - Medio de Clark y Lubs ( caldo RM/VP)
3. Reactivos para la lectura de las reacciones bioquímicas
4. Estufa de 37°C
5. Ansas

#### MÉTODO

• **Primer día:** siembra de los microorganismos en los medios de cultivo citados según indicaciones del docente.

Todos los cultivos se llevarán a incubar a estufa a 37°C por el tiempo que demande cada prueba.

• **Segundo día:** se llevará a cabo la prueba de la oxidasa y se procederá a la lectura de los resultados de las pruebas, agregando los reactivos correspondientes a aquellas que así lo requieran.

Se dejarán en incubación los medios de cultivo sembrados en las pruebas que necesitan un tiempo más prolongado para su lectura (RM, citrato).

Se procederá a la lectura según Tabla para identificar al microorganismo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Bailey y Scott. *Diagnóstico Microbiológico*.
- Mac Faddin J. F. Ed. *Pruebas bioquímicas de Identificación de Bacterias importantes en clínica*. Panamericana.
- Koneman. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Panamericana.
- Davis Dulbeco y Col. *Tratado de Microbiología*. Ed. Salvat.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología de Bioquímica*. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. 1993.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología de Farmacia*. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. 2002.



## Trabajo Práctico N° 10

### IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS AEROBIOS

#### INTRODUCCIÓN

En el Cuadro 10.1 se detalla la clasificación de los cocos Gram positivos aerobios de mayor importancia médica.

**CUADRO 10.1. COCOS GRAM POSITIVOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
<i>Micrococcaceae</i> Cocos Gram positivos catalasa positiva	<i>Micrococcus</i>	spp
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
		<i>epidermidis</i>
		<i>saprophyticus</i>
		<i>haemolyticus</i>
Cocos Gram positivos catalasa negativa	<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i> (grupo A)
		<i>agalactiae</i> (grupo B)
		grupos C y G
		<i>pneumoniae</i>
		estreptococos del grupo viridans
		otros estreptococos
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
		<i>faecium</i>
		<i>avium</i>
		<i>raffinosis</i>

#### IDENTIFICACIÓN DE *MICROCOCCACEAE*

La fermentación positiva de glucosa en anaerobiosis por los estafilococos diferencia los géneros *Micrococcus* (-) y *Staphylococcus* (+).

#### GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Los estafilococos son los microorganismos que producen la mayoría de las infecciones en humanos. Se detalla a continuación la diferenciación de *Staphylococcus* spp teniendo en cuenta además las especies de este género más frecuentemente aisladas en el laboratorio.

#### Características bioquímicas más importantes utilizadas en la identificación del género

##### *Staphylococcus*

- Producción de coagulasa
- Sensibilidad a la novobiocina
- Hidrólisis del DNA
- Utilización del manitol en el medio de Chapman

#### Otras pruebas utilizadas en la identificación de las especies del género

Fosfatasa alcalina, ornitina decarboxilasa, hidrólisis de la urea, producción de acetoina (VP), producción de pirrolidonil arilamidasa (hidrólisis del Pyr), producción de ácido a partir de diversos azúcares.

## IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS, CATALASA NEGATIVA (ESTREPTOCOCOS Y GÉNEROS RELACIONADOS)

La identificación de cocos Gram positivos, catalasa negativa, es dificultosa. La taxonomía de estos microorganismos está en continua revisión. No es sencillo aún para el laboratorio alcanzar el nivel de género en muchos casos, por lo que resulta prácticamente imposible usar un esquema simplificado para su identificación presuntiva.

### Características bioquímicas más importantes utilizadas en la identificación de cocos Gram positivos, catalasa negativa

- Hemólisis
- Prueba de la bilis esculina (crecimiento en bilis e hidrólisis de la esculina)
- Desarrollo en caldo CINa al 6,5%
- Producción de pirrolidónil arilamidasa (hidrólisis del Pyr)
- Prueba de susceptibilidad a la bacitracina
- Prueba de susceptibilidad a la optoquina
- Sensibilidad a la vancomicina
- Prueba de la solubilidad en bilis
- Hidrólisis de hipurato
- Prueba CAMP

A continuación, se describirán algunas pruebas bioquímicas más empleadas en la identificación de cocos Gram positivos. Se remite a los alumnos al uso de la bibliografía complementaria que figura en esta Guía para completar el estudio.

En todas las pruebas usadas en la identificación de cocos Gram positivos es menester ensayar cada nueva partida de medios, reactivos y drogas con organismos que den reacciones positivas y negativas.

### - PRUEBA DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en oxígeno y agua.

Esta prueba se lleva a cabo en portaobjetos, y es comúnmente utilizada para diferenciar estafilococos de estreptococos, donde la prueba da positiva y negativa, respectivamente.

#### Técnica

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

2- Añadir 1 ó 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.

La prueba no podrá aplicarse si el agar sangre es introducido en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por la presencia de peroxidasa en los eritrocitos.

No mezclar con la aguja o el ansa de inoculación.

#### INTERPRETACIÓN

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



### - PRUEBA DE LA COAGULASA

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

Algunas cepas de *S. aureus* producen sólo coagulasa “libre”. Por lo tanto, todas las pruebas negativas en portaobjetos deben repetirse utilizando la técnica en tubo.

#### 1. COAGULASA FIJA (PRUEBA EN PORTAOBJETOS)

La coagulasa fija, conocida como “factor de aglutinación”, está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos.

##### Técnica

Se coloca una gota de agua destilada o solución fisiológica estéril sobre un portaobjeto. Emulsionar suavemente una suspensión de un cultivo fresco del organismo en estudio. Mezclar bien y agregar una gota de plasma de conejo. Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado. Observar inmediatamente la formación de un precipitado granular. Si el resultado es negativo ensayar la producción de coagulasa en tubo.

#### 2. COAGULASA LIBRE (PRUEBA EN TUBOS)

La coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina, que se halla presente en los filtrados de cultivos.

##### Técnica

Se lleva a cabo sembrando en 0,5 ml de plasma (con EDTA y no citratado ya que organismos capaces de metabolizar el citrato como *Enterococcus* spp pueden dar resultados falsos positivos) con un ansa que contenga abundante material de la colonia sospechosa. Mezclar por rotación suave. Las pruebas negativas luego de cuatro horas de incubación a 35°C, dejar a temperatura ambiente y leer luego de 18-24 horas a fin de evitar la fibrinólisis que producen algunas cepas al ser incubadas en forma prolongada a 35°C.

Las cepas coagulasa positiva producen un coágulo visible.

#### - PRUEBA DEL MANITOL

El agar manitol es un medio selectivo para la demostración de estafilococos patógenos en alimentos y otros materiales objeto de investigación, según Chapman (1945), modificado.

Debido a la concentración extremadamente alta de sal, permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentran, entre otros, los del género *Staphylococcus*. La degradación del manitol, con formación de ácido, está notablemente correlacionada con la patogenicidad del germen en cuestión y sirve, por lo tanto, como indicativo de la presencia de *Staphylococcus aureus*.

##### Técnica

La siembra se realiza en superficie, por estría. Debido al potente efecto inhibitorio de este medio, debe sembrarse masivamente. Se incuba hasta tres días a 37°C.

##### Interpretación

- **Manitol positivo:** colonias con halo amarillo luminoso; crecimiento intenso, indicativo del *Staphylococcus aureus*.
- **Manitol negativo:** colonias sin cambio de color y casi siempre crecimiento débil, indica *Staphylococcus epidermidis* y otros.

#### - PRUEBA DE LA DNASA

La DNAsa es una enzima que desdobra el ácido desoxirribonucleico en sus nucleótidos, Permite la diferenciación de *S. aureus* (+) de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (-).

##### Técnica

Se siembra el microorganismo en una estría sobre el agar que tiene el DNA al 0,2%, incorporado. Se incuba 18-24 horas Inundar la placa con HCl 1 N (también puede usarse HCl al 10%).

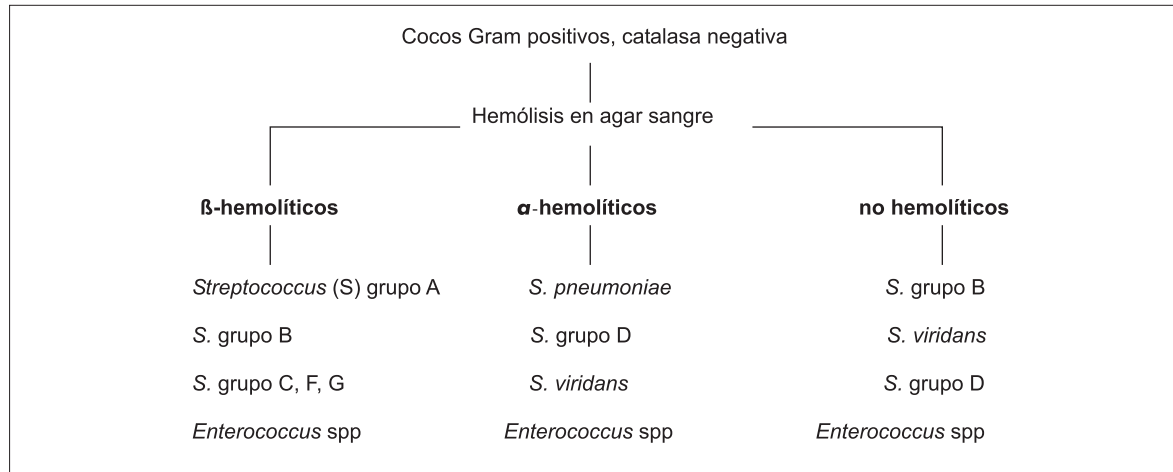
**Interpretación**

- Positiva: una zona clara alrededor del cultivo (se ha desdoblado el DNA)
- Negativa: no se advierte zona clara (las sales de DNA son precipitadas por el HCl)

**- PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA**

En agar Mueller Hinton, según técnica de Kirby-Bauer, efectuar una siembra masiva del organismo a investigar, utilizando discos de novobiocina (5 µg) en el centro de la siembra. Incubar 24 horas y leer. Sensible; inhibición del desarrollo con un diámetro mayor o igual a 16 mm.

**IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS, CATALASA NEGATIVA**



Es importante observar la hemólisis en agar sangre para orientar la identificación de estas bacterias. Las reacciones hemolíticas pueden variar según la especie del cual proviene la sangre.

**- 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 horas 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 desarrollo de colonias y ennegrecimiento del medio.

**- PRUEBA DE LA BACITRACINA**

La bacitracina es un antibiótico que inhibe el desarrollo de algunos estreptococos.

Se hace una siembra masiva en la placa de agar sangre y se coloca el disco de bacitracina (0,04 U) en el centro de la siembra. La incubación se realiza con CO<sub>2</sub> durante 18-24 horas. Cualquier zona de inhibición es considerada positiva. No se deben colocar los discos de bacitracina en forma directa en las placas primarias de cultivo porque dan un 50% de falsos negativos.

**- PRUEBA DE LA OPTOQUINA**

La técnica se lleva a cabo de la misma manera que la prueba de la Bacitracina pero se usa la optoquina en lugar de la Bacitracina. Se incuba con CO<sub>2</sub> durante 18-24 horas. Los halos de inhibición deben medirse. Para un disco de 6 mm conteniendo 5 µg de optoquina, una zona de inhibición del crecimiento de 14 mm o más indica susceptibilidad a la optoquina. Si este diámetro es menor, se debe realizar la prueba de solubilidad en bilis.



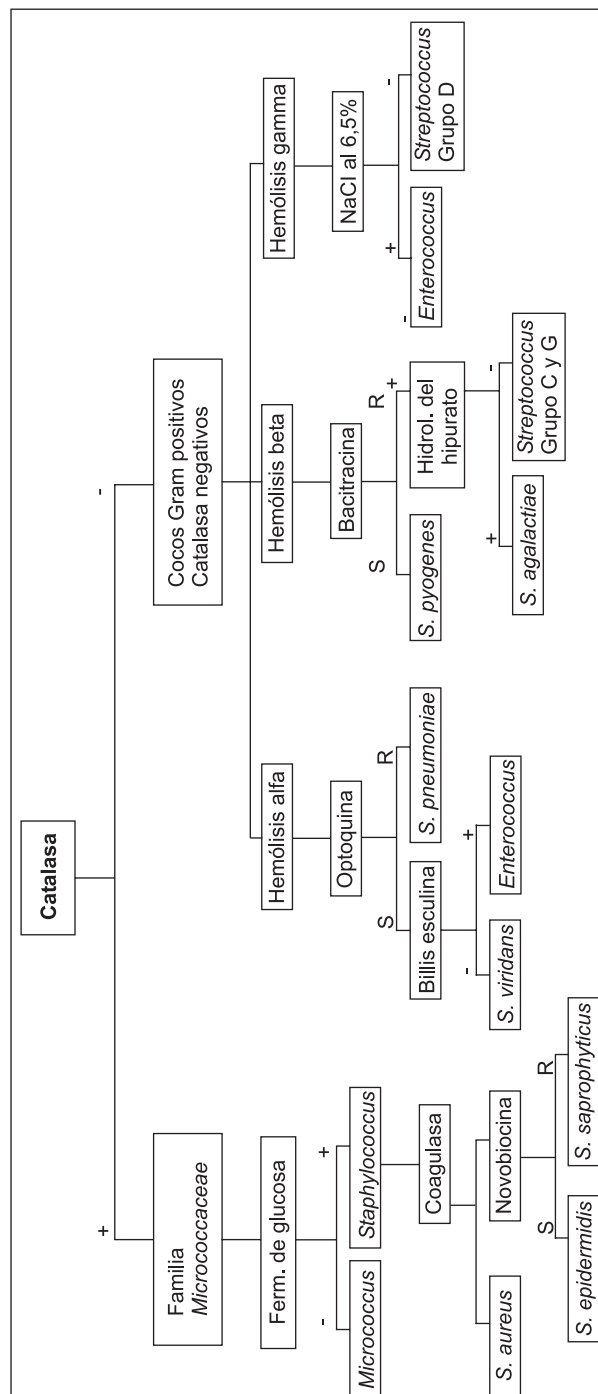
**DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS**

En el siguiente Cuadro se presentan las pruebas comúnmente utilizadas para la diferenciación de las especies de *Staphylococcus* más importantes.

**CUADRO 10.2. PRUEBAS MÁS UTILIZADAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS**

	Manitol	DNAsa	Coagulasa	Novobiocina
<i>S. aureus</i>	+	+	+	S
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	S
<i>S. aprophyticus</i>	+	-	-	R

**IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS**



## Desarrollo Práctico Nº 10

### IDENTIFICACIÓN COCOS GRAM POSITIVOS AEROBIOS

1. Sembrar la muestra para aislamiento en agar sangre.
2. Incubar a 37°C (en atmósfera de CO<sub>2</sub> en caso de ser necesario).
3. Observar aspecto de colonias y realizar coloración de Gram.
4. Proceder a la siembra de los medios de cultivo indicados para realizar las pruebas bioquímicas.
5. Lectura de los resultados e identificación de los microorganismos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Mac Faddin J. F. *Pruebas bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia clínica*. Ed. Panamericana.
- Koneman. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Panamericana.
- Davis Dulbeco y Col. *Tratado de Microbiología*. Ed. Salvat.
- *Identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas*. Módulo 3. Asociación Argentina de Microbiología.
- *Infecciones Bacterianas; el laboratorio y la clínica*. Año 2000. Cátedra de Bacteriología. FCEQyN-UNaM.
- *Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología de Bioquímica*. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. 1993.
- *Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología de Farmacia*. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM.



Centro Gráfico de la  
Editorial Universitaria

**Interior impreso en el mes de abril de 2009  
en el Centro Gráfico de la  
EDITORIAL UNIVERSITARIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES  
San Luis 1870  
Posadas, Misiones**