

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS MICROBIOLOGÍA GENERAL

MODULO DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**MARUCCI RAUL
JORDA GRACIELA
GUIDA ADRIANA
SALVI GRABULOSA MARCELO**

EDITORIAL UNIVERSITARIA



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

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

Correos electrónicos:
edunam-admini@arnet.com.ar
edunam-direccion@arnet.com.ar
edunam-produccion@arnet.com.ar
edunam-ventas@arnet.com.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra

Coordinación de la edición: Claudio O. Zalazar

Armado de interiores: Javier B. Giménez

Jordá, Graciela Beatriz
Guía de trabajos prácticos: micología general. -1a ed.-
Posadas: EdUNaM - Editorial Universitaria
de la Universidad Nacional de Misiones, 2010.
112 p. ; 30x21 cm.
ISBN 978-950-579-160-6
I. Micología. I. Título
CDD 616.969

Fecha de catalogación: 28/04/2010

ISBN: 978-950-579-160-6
Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, 2010.

ÍNDICE

Trabajo Práctico N° 1. Esterilización	5
Trabajo Práctico N° 2. Medios de Cultivo	25
Trabajo Práctico N° 3. Microscopía: Examen en Fresco	35
Trabajo Práctico N° 4. Microscopía: Coloración de Gram	39
Trabajo Práctico N° 5. Microscopía: Coloración de Ziehl- Neelsen.....	45
Trabajo Práctico N° 6. Técnicas de Siembra, Aislamiento y Recuento de Germen Aerobios	51
Trabajo Práctico N° 7. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacilos Gram Negativos Aerobios o Facultativos	59
Trabajo Práctico N° 8. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Cocos Gram Positivos	75
Trabajo Práctico N° 9. Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana	83
Trabajo Práctico N° 10. Resistencia Bacteriana. Betalactamasas	89
Trabajo Práctico N° 11. Análisis Bacteriológico de Aguas-Colimetrica	99

Adriana Marcela Guida

- Bioquímica. Especialista en Microbiología clínica.
- Jefe de Trabajos de la Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Integrante por afectación de la Cátedra de Virología de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Investigador Categoría IV.
- Integrante del Proyecto de investigación: "Actividad antimicrobiana y estudios fitoquímicos de plantas medicinales de uso regional". Centro de investigación y desarrollo tecnológico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Integrante del Proyecto de investigación: "Staphylococcus aureus en Manipuladores de alimentos". Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.

Graciela Beatriz Jordá

- Bioquímica. Especialista en Microbiología clínica.
- Profesor Adjunto Trabajos de la Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Profesor Adjunto de la cátedra de Virología de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Investigador Categoría IV.
- Integrante del Proyecto de investigación: "Actividad antimicrobiana y estudios fitoquímicos de plantas medicinales de uso regional". Centro de investigación y desarrollo tecnológico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- Vicedirectora del Proyecto de investigación: "Staphylococcus aureus en Manipuladores de alimentos". Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.

Salvi Grabulosa Marcelo Ceferino

- Bioquímico- Esp. en Microbiología Clínica.
- Docente, auxiliar de trabajos prácticos, de la cátedra de Microbiología de la Carrera de Farmacia, desde el año 1998 al año 2.000.
- Docente, auxiliar de 1º simple JTP de la Cátedra de Inmunología de la Carrera de Bioquímica desde el año 2.000 y continuo.
- Docente auxiliar de 1º simple JTP de la Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica desde el año 2009.
- Colaboración en el dictado de la Cátedra de Practica Hospitalaria como Profesional del sector de Bacteriología Clínica en el Laboratorio del Hospital Provincial de Pediatría hasta el año 2003.
- Integrante de Equipos de Investigación en:
 - "Diagnostico del agente causal de coqueluche por métodos bacteriologicos y de biología molecular en la provincia de misiones". 2005-2006.
 - "Estudio de los agentes etiologicos microbianos de meningitis aguda en misiones". 2.006 y continuo.

Raúl Salomón Marucci

- Licenciado en Química Orientación Analítica.
- Profesor titular regular Cátedra de Microbiología General de la carrera de Bioquímica y Cátedra de Microbiología de Ing. Química.
- Docente Investigador Categoría II.
- Director del Proyecto de investigación: "Staphylococcus aureus en Manipuladores de alimentos". Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la UNaM.
- PREMIO OBTENIDO.
- Premio al mejor trabajo de investigación con aplicación a la industria en el sexto congreso latinoamericano de microbiología en alimentos - MICROAL 2000. Otorgado por PUBLITEC, editorial de la Revista La Alimentación Latinoamericana.
- "Micoflora de Té (Camellia sinensis) elaborado y comercializado en Misiones Argentina."

TRABAJO PRÁCTICO Nº 1 ESTERILIZACIÓN

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Esterilización es un término absoluto que implica la pérdida de la viabilidad de todos los microorganismos contenidos, incluso los endosporos bacterianos muy resistentes, en un objeto o sustancia por el uso de un procedimiento físico o químico, o su separación por filtración. Esta definición excluye por lo tanto cualquier técnica que resulte solamente en un daño a los microorganismos o atenuación de la actividad de cualquier tipo. Se entiende por pérdida de viabilidad, a la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción, no implicando necesariamente la destrucción de todas las enzimas constitutivas o de sus productos metabólicos: toxinas, etc. los que podrían permanecer luego del proceso de esterilización. Un ejemplo de ello son las sustancias pirogénicas (por lo general no proteicas) que no son eliminadas de los inyectables por el proceso de esterilización habitual, que introducidas al torrente sanguíneo provocan un cuadro febril.

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que hacemos en el laboratorio, cuando flameamos un anillo de platino o las bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers.

El calor húmedo de autoclave a vapor y el óxido de etileno son los principales agentes esterilizadores que se usan en los hospitales.

La **Desinfección** es generalmente un proceso menos letal que la esterilización. Los desinfectantes eliminan prácticamente todos los microorganismos patógenos, pero no necesariamente todas las formas microbianas (endosporas bacterianas) de los objetos inanimados. Los Antisépticos, en cambio, controlan y reducen la presencia de microorganismos potencialmente patógenos sobre piel y/o mucosas (sólo pueden aplicarse externamente sobre seres vivos).

En la práctica microbiológica es necesario llevar a cabo la esterilización, al fin de que al sembrar un microorganismo determinado en un cierto medio de cultivo las manifestaciones de vida que se evidencian se pueden asignar con seguridad a dicho microorganismo y no a una mezcla de varios.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN



A) MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN BASADOS EN LA MUERTE MICROBIANA:

A) MÉTODOS FÍSICOS

Calor

Los métodos basados en la aplicación del calor como agente esterilizante son preferidos para esterilizar todos los materiales, excepto aquellos que sufren daños por su termosensibilidad. El proceso es rápido, todos los microorganismos son susceptibles, y el calor llega a lugares que podrían estar protegidos para agentes químicos.

El mecanismo de éste como agente esterilizante implica desnaturalización proteica, fusión y desorganización de membranas, y/o la ocurrencia de procesos oxidativos irreversibles.

La acción deletérea sobre lípidos y proteínas, requiere mayores temperaturas cuando el material está totalmente seco debido a que:

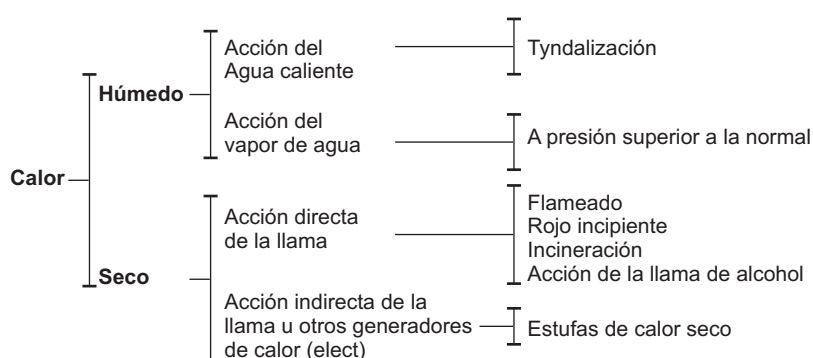
La conformación nativa de una proteína se estabiliza, en parte, por uniones puente de hidrógeno entre distintos restos de la cadena peptídica. Estas uniones pueden ser fácilmente reemplazadas por uniones puente de hidrógeno con moléculas de agua. El agua es una especie química muy reactiva.

El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Por lo que, los materiales húmedos conducen el calor mucho más rápidamente que los materiales secos debido a la energía liberada durante la condensación del vapor sobre su superficie (540 cal/gr.).

Esto explicaría por qué se requiere mayores temperaturas para causar un daño irreversible por calor seco.

Los hongos, la mayoría de los virus y las células vegetativas de varias bacterias patógenas, pierden la capacidad de reproducirse en unos pocos minutos a temperaturas entre 50-70°C y los esporos de algunos microorganismos a 100°C. Es por ello que el uso de las prácticas de “esterilización” de agujas, jeringas, etc. por calentamiento a ebullición, común en tiempos pasados, debe ser abandonado porque no aseguran la pérdida de viabilidad de los endosporos bacterianos resistentes.

Aquellos que utilizan el calor como métodos de esterilización lo podemos dividir en el esquema siguiente:



ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

CONDICIONES DEL PROCESO:

Las condiciones a tener en cuenta son: **Temperatura - Tiempo - Presión**

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

Mecanismo de acción: el principal mecanismo responsable de la muerte microbiana es la coagulación de las proteínas, por acción de vapor de agua saturado.

¿Qué es el Vapor Saturado?: es el vapor que ocupa o colma un ambiente dado, esta constituido por el máximo posible de agua, que de acuerdo con el volumen y la temperatura del recinto, puede estar suspendida en forma de vapor y no de líquido. El vapor saturado es el más concentrado que puede existir en un recinto de volumen y temperatura dados. Es el máximo y constante poder esterilizante.

PRECAUCIONES:

El Vapor de Agua Saturado es un agente esterilizante que actúa únicamente por contacto, razón por la cual los materiales deberán disponerse de tal manera que se asegure el íntimo contacto de todas sus partes con el vapor: pinzas abiertas, jeringas desensambladas, textiles adecuadamente acondicionados.

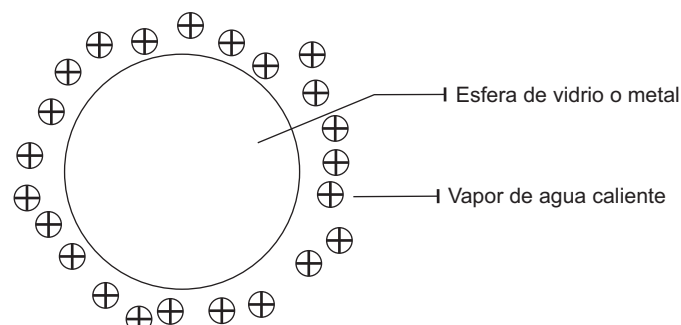
No se propaga en el espesor o masa de las substancias, materia y cuerpos que se someten a su acción igual a como lo hace el Calor Puro.

Para que la asociación de calor y agua al estado de vapor mantenga su alto poder mortífero sobre los microorganismos debe mantener intacta esa asociación íntima de “energía calórica” y “materia acuosa”. Esta es una de las nociones de mayor importancia para poder comprender bien el proceso de la esterilización por Vapor de Agua.

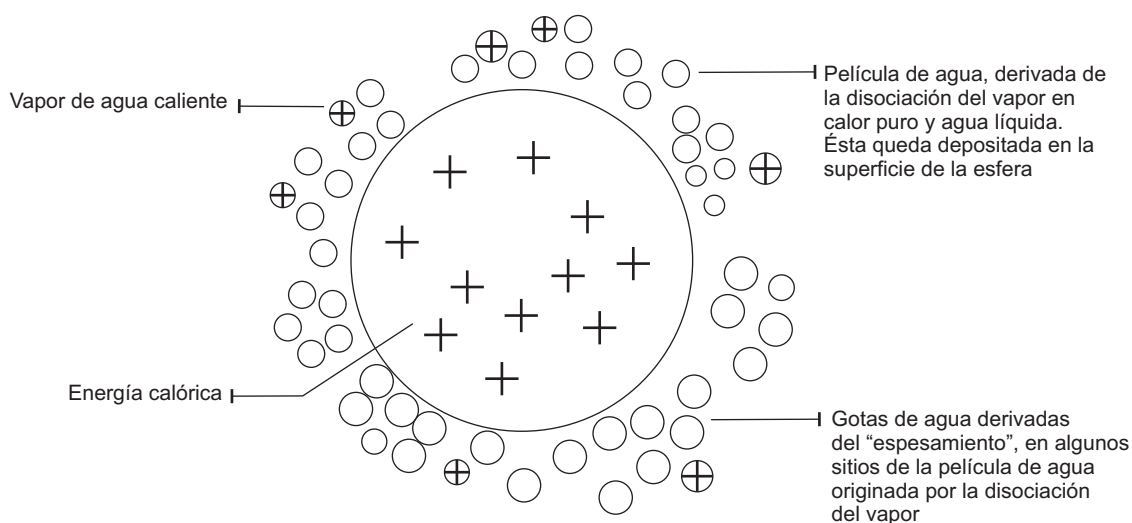
Equipo: El vapor de agua saturado se genera -para la esterilización- en la caldera de un autoclave, por ebullición de agua sometida a presión controlada y mantenida.

Consta de una caldera de cobre, sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas o por una resistencia eléctrica, esta se cierra en la parte superior por 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 una válvula de seguridad que funciona por contrapeso o a resorte.

1- Al comienzo



2- Posteriormente



Normas de uso general:

- 1- Controlar siempre el autoclave antes de usar:
- 2- Verificar el estado general y limpieza interior.
- 3- El nivel de agua: completar con agua en caso de ser necesario. No debe sobrepasar los orificios de la bandeja.
- 4- Posición abierta de la espita.
- 5- Funcionamiento de la válvula de seguridad.

Cumplidos estos requisitos se procede a:

- a) Introducir y disponer correctamente el material a esterilizar.
- b) Cerrar perfectamente la tapa.
- c) Encender la fuente de calor.
- d) Purgar perfectamente para eliminar el aire del interior de la cámara de esterilización.
- e) Cerrar la espita.
- f) Cuando alcanza la presión deseada (indicadora de la temperatura), se comienza a contar el tiempo de esterilización regulando la llama a fin de mantener la presión uniforme durante todo el proceso de esterilización.
- g) Una vez concluido el proceso apagar la fuente de calor y dejar disminuir la presión espontáneamente sin abrir la espita.
- h) No enfriar artificialmente el autoclave.
- i) Cuando el manómetro indica que la presión ha llegado a cero, abrir la espita a fin de eliminar cualquier exceso de presión residual.
- j) Abrir el autoclave y retirar el material estéril.

Cuando el autoclave no está en uso, la tapa debe permanecer apoyada sobre el cuerpo del autoclave. Limpiar periódicamente la cámara y el depósito de agua a fin de eliminar posibles incrustaciones.

En el uso del autoclave, es muy importante permitir que el vapor fluyente desplace totalmente el aire de la cámara de esterilización que está ocupando la parte inferior de la misma, del material que se va a esterilizar y de los componentes de protección aséptica del mismo. De no ser así la presión resultante será la suma de las presiones parciales del aire y del vapor del agua.

Teniendo en cuenta que para la misma presión, la temperatura del aire es mucho menor que la del vapor del agua, la temperatura resultante será tanto menor, cuanto mayor contenido de aire tenga la cámara.

A este procedimiento de eliminación de todo el aire que contenga el autoclave se denomina purgado.

ACONDICIONADO DEL MATERIAL Y PRECAUCIONES

Los recipientes a colocar en los autoclaves, no deben estar totalmente llenos, y deben tener tapas flojas o estar tapados con algodón, con una sobretapa, para permitir la ebullición libre y la liberación del aire disuelto.

Con objetos porosos grandes o grandes volúmenes de líquido, debe permitirse un mayor tiempo de purgado.

Si se esterilizan elementos tubulares conviene humedecerlos con agua destilada, para que el vapor generado expulse el aire.

Ventajas del método

Reconocido como el más efectivo, rápido, económico y sin efectos adversos.

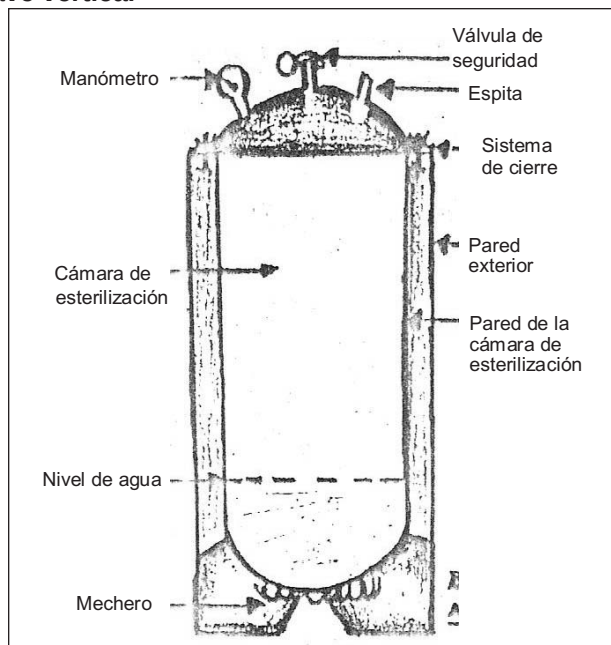
Desventajas

No se puede emplear para esterilizar sustancias no miscibles con el agua. ej. aceites o vaselina, (los que se deben esterilizar por calor seco, en estufa, teniendo la precaución de que la temperatura de esterilización no sea superior a la temperatura de descomposición del aceite).

Tampoco se esterilizan de esta manera sólidos y materiales pulverulentos insolubles, como talco, caolín.

Es decir que el vapor de agua saturado y a una temperatura de 121 - 123°C solo serviría para esterilizar las superficies de dichos materiales, ya sean sólidos o líquidos.

Esquema de autoclave vertical



MATERIALES QUE SE PUEDEN ESTERILIZAR CON VAPOR

La esterilización en autoclave se utiliza para todo el material termorresistente que no sea afectado por el vapor de agua, y para microorganismos situados **en la superficie** del material insoluble y también de aquellos situados en la **masa hidrosoluble** del material a esterilizar.

- 1- Medios de cultivo y soluciones.
 - 2- Material de vidrio (luego debe ser secado).
 - 3- Material de goma.
 - 4- Instrumental quirúrgico de acero inoxidable.
 - 5- Soluciones acuosas.
 - 6- Todo aquel material cuyo fabricante certifique pueda ser esterilizado por vapor
 - 7- Material textil, siempre que el autoclave esté provisto de un sistema de secado por vacío.
- Por esta razón habitualmente se lo esteriliza en estufa a 170-160°C durante 1 a 2 horas.

MATERIALES QUE NO SE PUEDEN ESTERILIZAR CON VAPOR

- 1- Sustancias oleosas.
- 2- Sustancias grasas.
- 3- Polvos.
- 4- Instrumental quirúrgico cromado o niquelado.
- 5- Artículos eléctricos sin cobertura especial.
- 6- Todo material que no tolera la exposición al calor y la humedad.

PASTEURIZACION

El principio general de la pasteurización es la eliminación selectiva de la población microbiana sensible al calor que se encuentra en la leche y otros alimentos. Elimina todos los gérmenes patógenos, no esporulados. Esta temperatura no esteriliza la leche, pero sí elimina todas las bacterias productoras de enfermedades que comúnmente son transmitidas por ella.

La pasteurización consiste en mantener la leche o los alimentos en recipientes a 62°C durante 30 minutos, e inmediatamente seguida de un enfriamiento rápido.

La enterotoxina estafilocócica que es termoestable, si está presente, no queda inactivada por la pasteurización y puede causar una intoxicación alimenticia.

TINDALIZACION

Esta técnica para esterilizar sustancias que se descomponen fácilmente a altas temperaturas como los sueros sanguíneos, el líquido ascítico, soluciones albuminosas, soluciones azucaradas, etc.

Consiste en colocar el material que se quiere esterilizar en recipientes adecuados y someterlos, al baño María a una temperatura que varía entre 55° y 60°C durante una hora. Luego se deja enfriar, manteniéndolo a temperatura ambiente durante 24 horas, se repite el calentamiento al cabo de este tiempo y otra vez a las 48 horas.

Tyndall, considera que durante el primer calentamiento se destruye la forma vegetativa, quedando los esporos que luego se desarrollan y dan otras formas vegetativas, que son destruidas en los calentamientos posteriores. Actualmente se acepta la posición de Duclau, quien sostiene que el protoplasma del espora se modifica por una hidratación progresiva que lo hace más vulnerable, y llega a la destrucción.

ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

Aquí son primordiales los procesos oxidativos y de fusión de membrana por sobre la desnaturalización proteica.

Los métodos más empleados son:

1) ACCIÓN DIRECTA DE LA LLAMA

a) Flameado:

Se aprovecha la llama de un mechero de Bunsen o similar. Se utiliza para esterilizar varillas, planchas de vidrio, espátulas, bocas de recipientes de vidrio, etc. Más que un método real de esterilización, reduce la chance por contaminación ambiental.

b) 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.

c) Acción de la llama de alcohol:

Se vierte una cantidad apropiada de alcohol que permita, al encenderlo, que su llama alcance toda la superficie a esterilizar durante varios minutos. Se utiliza para morteros, material de vidrio, material de cirugía, etc. (Es un procedimiento de emergencia).

d) Incineración:

Obviamente es utilizado para material de descarte.

2) GENERADORES DE CALOR ELÉCTRICO

Condiciones del proceso:

Las condiciones a tener en cuenta son: *Temperatura-Tiempo*.

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

Mecanismo de acción: la muerte microbiana se produce como consecuencia de mecanismos de transferencia de energía, además de la oxidación.

Precauciones: Reiteramos la necesidad de asegurar que el material que será sometido tanto a este procedimiento, como a todos los demás, deberá estar limpio y seco. Se enfatiza la necesidad de un calentamiento uniforme de todo el objeto a esterilizar. Debe permitirse la convección del aire no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

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

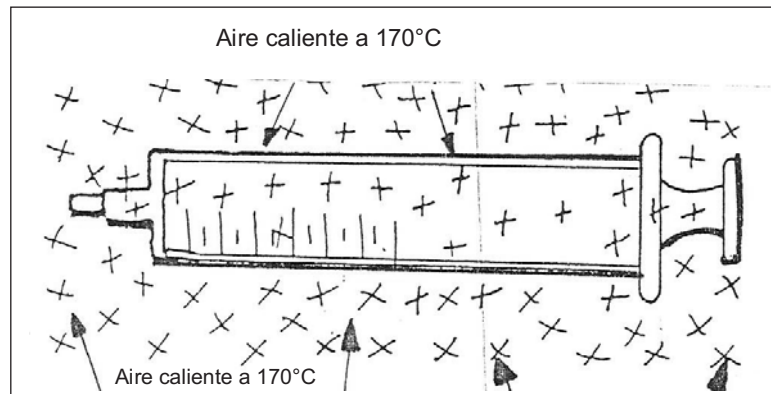
Equipos: Estufas u hornos de esterilización por calor seco. El calor puro o simplemente, el calor es energía en forma de calor. El calor no es materia no tiene peso. El calor es algo intangible e intocable, que penetra a través de cualquier materia, que la invade, sea cual fuese ella, atravesándola o introduciéndose en ella con mayor o menor facilidad, pero haciéndolo siempre

que dicha materia esté a menor temperatura que la del calor que está en trance de atravesarla o de introducirse en ella.

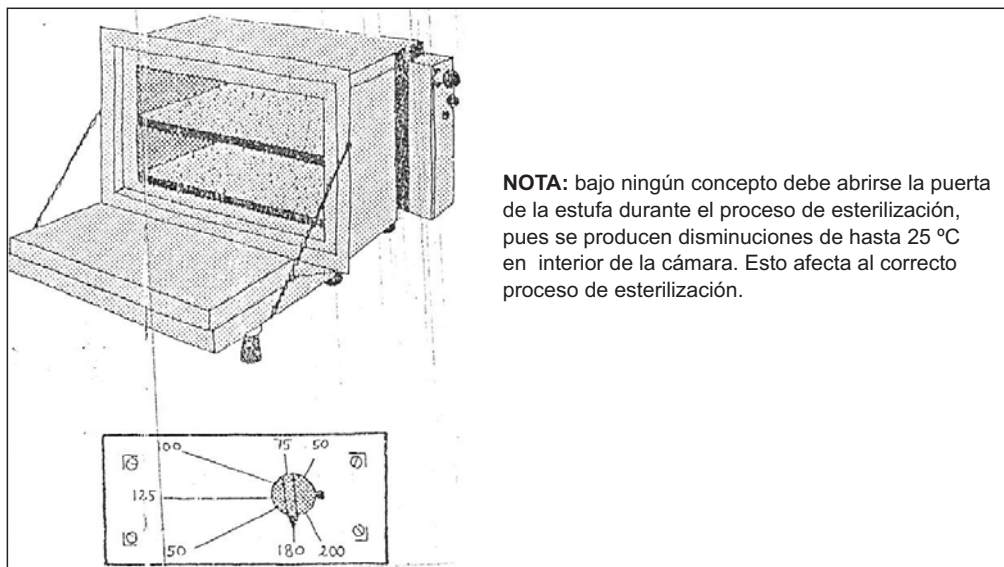
El calor se dirige desde los puntos de mayor temperatura a los de menor temperatura, cesando la propagación del calentamiento cuando en todos los puntos se igualó la temperatura.

El papel y el algodón, así como el material acondicionado con estos elementos, no deben esterilizarse a más de 170°C, ya que se carbonizan.

En forma estándar, para material de vidrio, placas de Petri, tapones con pipetas, etc. se utilizan 1 hs. a 170°C.



Esquema de una estufa de esterilización:



Materiales que se pueden esterilizar por este método:

1. Instrumental cromado.
2. Objetos de vidrio, aluminio y porcelana.
3. Compuesto minerales termoestables en forma de polvo (talco, bórax).
4. Vaselina, parafina, sustancias grasas, aceites.

Materiales que no se pueden esterilizar por este método:

1. Material textil: algodón, sedas, etc.
2. Materiales sintéticos y gomas.
3. Instrumental óptico.
4. Material eléctrico.
5. Todo material sensible a la temperatura de trabajo.

NORMAS DE USO GENERAL

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

RADIACIONES

Las que se utilizan en la práctica pueden ser:

- 1) Ionizantes.
- 2) Rayos ultravioletas.

1) Radiaciones Ionizantes

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

Las radiaciones gamma se utilizan, dado su gran penetrabilidad, principalmente para esterilizar materiales termolábiles (ejemplo: jeringas descartable, sondas, etc.) en escala industrial ya que se requiere la existencia de instalaciones complejas y costosas.

No son utilizadas para medios de cultivo o soluciones proteicas porque se producen alteraciones de sus componentes.

La Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), en relación al reactor de Ezeiza, tiene un servicio de esterilización de materiales como jeringas, plásticos y alimentos ofrecidos a la industria y/o universidades.

Las variables del método de esterilización por radiación son:

- La dosis a que se someterá el material.
- El tiempo de exposición.

2) Radiaciones Ultravioletas

La radiación U.V.C. (Ultra violeta Corta) con longitudes de onda de aproximadamente 260 nm afectan principalmente a los ácidos nucleicos de los microorganismos por formación de pares de pirimidinas, los que llevan a la pérdida de viabilidad.

Son escasamente penetrantes por lo que su uso está restringido a esterilización de superficie, agua límpida en capas muy delgadas, y fundamentalmente a esterilización o descontaminación del aire.

B) AGENTES QUÍMICOS

Generalmente se utilizan agentes alquilantes. Los efectos letales del formaldehído, óxido de etileno y glutaraldehído son resultado de su acción alquilante sobre las proteínas. Las inhibiciones producidas por tales agentes son irreversibles, dando como resultado modificación enzimática e inhibición de la actividad enzimática,

ÓXIDO DE ETILENO

Agente esterilizante: óxido de etileno

Es una sustancia altamente reactiva: con agua forma etilenglicol, con grupos aminoproteicos se produce alquilación.

Mecanismo de acción: actúa por alquilación de las proteínas constituyentes de las membranas microbianas, aun en estado de esporas.

Las **variables de un proceso de esterilización** por agentes químicos son: la concentración del agente, la temperatura, el tiempo de exposición, la humedad y la presión.

Precauciones es un gas sumamente explosivo cuando se mezcla con el aire, para evitar este riesgo se usa con dióxido de carbono o freones.

Es un gas vesicante por lo que no puede ser liberado directamente a la atmósfera, sino que se lo hace burbujear en agua, a fin de que se inactive.

Es un agente poco penetrante y debe ser eliminado totalmente debido a su toxicidad.

Efectos adversos

Debido a su alta toxicidad el óxido de etileno produce:

- Irritación de mucosas
- Manifestaciones gastrointestinales (nauseas, vómitos)
- Otras más severas: disnea, cianosis, migrañas, somnolencia, prurito, hemólisis, aberraciones cromosómicas, teratogenicidad y carcinogenicidad.

NOTA: 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.

Equipo

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.

La bomba de vacío debe ser anillo de agua o sistema venturi.

Deberá estar equipado con un dispositivo de calentamiento y humidificación, como así también con un sistema de seguridad en su cierre.

Materiales que se pueden esterilizar

1. Instrumental óptico.
2. Instrumental de microcirugía.
3. Implantes.
4. Prótesis.
5. Marcapasos.
6. Materiales termosensibles que no se alteren por la esterilización con óxido de etileno y no admitan otro procedimiento.
7. Respiradores
8. Reanimadores

El proceso es lento en equipos que utilizan mezclas (puede durar hasta 16 horas), pero es rápido, alrededor de una hora, en los equipos que (previo desplazamiento del aire existente) utilizan óxido de etileno puro. Generalmente se trabaja a 50 – 60 °C y se requiere un tenor de humedad a fin de optimizar su acción.



Materiales que no se pueden esterilizar:

- 1- Elementos que reaccionan químicamente con el agente esterilizante disminuyendo o anulando su actividad como tal.
- 2- En general todos aquellos elementos que pueden ser procesados por el calor húmedo o seco (ropa de algodón, gasa, aceites, polvos, soluciones acuosas, etc.)
- 3- Los materiales de PVC esterilizados por radiaciones gamma, no deben ser sometidos a su esterilización por óxido de etileno.

Acondicionamiento y precauciones:

El material debe estar limpio y seco.

Acondicionado de manera tal que permitan la libre circulación del gas por todas sus partes

MUY IMPORTANTE: de acuerdo a la categoría de los distintos materiales se accederá al proceso de desinfección correspondiente, pero SIEMPRE luego de haber pasado por una estricta limpieza.

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

MATERIALES	CALOR HUMEDO	CALOR SECO	OXIDO DE ETILENO
Material textil (Gasas, ropa, vendas, etc.)	R	No	N
Material plástico	R ^{1,8}	No	O ³
Material de goma	R	N	O ³
Instrumental de acero inox.	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 O = Optativo N = No 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.

⁴ solo para instrumental muy delicado de microcirugía.

⁵ solo cuando no se dispone de estufas.

⁶ solo cuando este tipo de materiales pertenece a un conjunto que debe esterilizarse con óxido de etileno. 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.

B) MÉTODOS BASADOS EN LA SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS

FILTRACIÓN

La esterilización por filtración se logra por el paso de un líquido a través de un material capaz de retener los microorganismos presentes. La esterilización por filtración se emplea para materiales sensibles al calor, como ciertos medios de cultivo, azúcares, sueros, soluciones de antibióticos y otros medicamentos, etc.

Hay varios tipos de filtros, los más usados son los filtros de profundidad y los filtros de superficie o filtros de membrana.

Filtros de profundidad

Están elaborados por un material fibroso (papel, asbesto o fibra de vidrio) dispuesto al azar, de manera que dentro de la estructura del filtro se crean vías tortuosas donde pueden quedar retenidos la mayoría de los contaminantes presentes.

Entre sus ventajas se encuentran su alta capacidad de retención de partículas sobre su superficie y a través de toda su estructura y que permiten filtrar grandes volúmenes.

Sin embargo, tienen como desventajas que no presentan un tamaño de poro uniforme y existe la posibilidad de liberación, hacia el material filtrado, de partículas.

Dadas sus características los filtros de profundidad se usan principalmente como prefiltros, ya que permiten eliminar las partículas grandes pero no la eliminación total de los microorganismos.

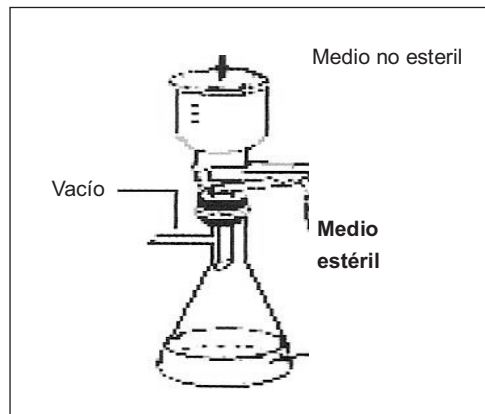
Filtros de superficie

Son filtros elaborados generalmente de acetato de celulosa o nitrato de celulosa y contienen poros de tamaño uniforme.

Este tipo de filtro tiene como ventaja que, al conocer exactamente el tamaño del poro que presentan, se pueden seleccionar filtros capaces de retener la totalidad de los microorganismos presentes en una solución. Sin embargo, se saturan rápidamente y la filtración a través de ellos es lenta.

Para la filtración esterilizante se pueden usar combinaciones de un filtro de profundidad con un filtro de superficie que tenga un tamaño de poro de $0,22\ \mu\text{m}$. La mayor parte de los filtros se pueden esterilizar en autoclave y luego se manipulan asépticamente al ensamblar el equipo.

Los filtros de membrana también son útiles en microbiología con otros propósitos además de la esterilización. Debido a que son inertes, proporcionan un método óptimo para la recolección de microorganismos, dado que cualquier agente bacteriostático presente en el medio en suspensión puede ser fácilmente lavado del filtro. Esta técnica ha sido invaluable en las pruebas de esterilidad de desinfectantes y antibióticos, en las cuales es necesario superar los efectos inhibidores de la droga. En Microbiología Clínica, ha sido útil para el cultivo de organismos presentes en bajas concentraciones en un gran volumen de líquido.



CONTROLES DE ESTERILIZACION Y DE ESTERILIDAD

Planteado un proceso de esterilización dado, contamos con distintas técnicas para comprobar la eficiencia del mismo. Independientemente del método elegido es necesario realizar un control para asegurar que el tratamiento ha sido adecuado.

A- Control de esterilización: Es el que se realiza para comprobar si se cumplieron las condiciones del método empleado.

B- 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.

A- Control de esterilización:

Los controles del proceso de esterilización pueden ser biológicos, físicos y químicos. El control físico y el control químico indican que las condiciones de esterilización son las adecuadas para que el proceso se lleve a cabo correctamente pero no asegura que los microorganismos sean eliminados.

El control biológico es el único que garantiza la eliminación deseada de los microorganismos.

1 - Control biológico del proceso de esterilización

Este tipo de control es comúnmente usado, ya sea solo o en conjunción con otros métodos, debido a su similitud biológica respecto al suceso que se quiera controlar (muerte de microorganismos).

Los controles biológicos son preparaciones estandarizadas de microorganismos específicos. Éstos son más resistentes y habitualmente están en un mayor número que los contaminantes a esterilizar. Deben usarse por lo menos una vez por semana para confirmar que un ciclo de rutina logra una verdadera esterilización.

Cuando se usa el autoclave a vapor se deben utilizar esporos de *Bacillus stearothermophilus* y con esterilizadores a gas o por calor seco, *Bacillus subtilis var niger*.

Los controles son procesados en forma conjunta con el material a esterilizar, preferentemente en las zonas donde sea más difícil la llegada del agente esterilizante.

Se los utiliza impregnados en soportes que facilitan su manipulación. Una vez concluido el proceso son inoculados en medios de cultivos apropiados.

Existen comercialmente ampollas que contienen el medio de cultivo, las cuales tienen incorporadas una suspensión de esporas a una concentración de 10^8 UFC/ml.

Se incuba el control de *B. subtilis* durante 48 hs a 37°C y *B. stearothermophilus* durante 48 hs a 55°C (hay que tener en cuenta las especificaciones del fabricante).

Desventaja:

No pueden ser leídos en forma inmediata por lo que el material sufre una demora en su utilización, a la espera de los resultados.

Procedimiento:

En cada operación se utilizarán dos tubos conteniendo el microorganismo incluido en el medio de cultivo; el N° 1 sin tratamiento (control de viabilidad de esporos) y el N° 2 que se someterá a calor húmedo (121°C durante 15 minutos.)

Si el procedimiento fue el correcto se observará, después de la incubación correspondiente:

- En el tubo N° 1 un viraje al amarillo debido al desarrollo del microorganismo.
- En el tubo N° 2 no se observará cambio de color (permanecerá violeta).

Si el procedimiento no fue el correcto se produce el desarrollo del microorganismo en los dos tubos.

En este ejemplo viró el color del medio de cultivo al **amarillo** debido al crecimiento del microorganismo, después de la esterilización por autoclave, lo que revela que el tratamiento ha sido **incorrecto**.



Método de esterilización empleado	Sobrevivencia de microorganismos	Muerte de los microorganismos
Vapor saturado a 121°C	5 minutos	15 minutos
Oxido de etileno		
25°C- 300 mg/l-60% HR	60 minutos	360 minutos
54°C- 600 mg/l-60% HR	15 minutos	120 minutos
54°C-1200 mg/l-60% HR	5 minutos	30 minutos
Dosis de radiación	0,5 mRad	1 mRad

2 - Controles físicos del proceso de esterilización:

Miden las condiciones ambientales dentro del sistema de esterilización. Al finalizar cada ciclo debe existir un registro gráfico que documente que el esterilizador ha alcanzado el vacío, la temperatura, humedad y presión adecuada.

3- Controles químicos del proceso de esterilización:

Son dispositivos especiales impregnados de compuestos químicos sensibles al cumplimiento de los parámetros de esterilización (tiempo, presión y temperatura).

Viran de color si se cumplen los parámetros físicos del autoclave

Deben ubicarse en la cámara interior o exterior del paquete de material.

Validar su viraje o cambio de color antes de usar el material.

B- CONTROL DE ESTERILIDAD:

En el control de esterilidad se comprueba en forma probabilística la ausencia de microorganismos en un determinado artículo. Es un resultado probabilístico, ya que se toma una parte representativa de la totalidad del lote esterilizado.

Existen dos métodos para llevar a cabo este test:

1)- Transferencia directa a medios de cultivo.

2)- Filtración por membranas.

Se debe testear un porcentaje preestablecido del material esterilizado, que depende del tamaño del lote. Este material debe tomarse de los lugares donde haya mayor dificultad en la llegada del agente esterilizante.

1)- Transferencia directa a medios de cultivo

Consiste en transferir una parte representativa de las muestras a medios apropiados que permitirán el crecimiento de cualquier contaminante, sea éste, bacteria (aerobia o anaerobia) o un hongo. Para ello están determinados los medios y las condiciones de cultivo:

TIOGLICOLATO (aerobios y anaerobios) incubando a 30 - 35°C.

DIGERIDO DE CASEINA SOJA (aerobios) incubando a 20 - 25°C.

En el test de esterilidad propiamente dicho se toman muestras representativas del lote esterilizado, se las incuba en los medios y en las condiciones mencionadas durante 14 días.

Se analiza el crecimiento por turbidez o por crecimiento superficial al 3°, 4°, 5°, 7°, 8° y 14° días.

Si no se observa crecimiento se dice que la muestra cumple con el control de esterilidad.

2)- Filtración por membranas:

En este método el líquido o el sólido disuelto en solvente adecuado es filtrado, a través de la membrana de 0,45 - 0,20 micrones de poro, que sea capaz de filtrar las bacterias presentes en la muestra.

Si se trabaja con sustancias de acción bacteriostática o fungistática, debe lavarse la membrana filtrante con una solución estéril y luego se procesa la membrana como una muestra en un test de esterilidad.

AREAS 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.

En la industria farmacéutica es necesario contar con recintos donde la contaminación sea lo mas baja posible, ya que algunos productos no pueden esterilizarse en su envase final (por ejemplo liofilizados de productos biológicos que se usarán para ser inyectados).

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 - Areas biolimpias convencionales.
- 2 - Areas biolimpias de flujo laminar.

1)- AREAS BIOLIMPIAS CONVENCIONALES:

Las áreas biolimpias convencionales utilizadas 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, cielorraso y se extrae a través de rejillas a pocos centímetros del piso. De modo que existen 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 puede eliminarse, 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

Según las principales fuentes de contaminación se pueden dividir en:

- a) Aire exterior
- b) Elementos localizados en el área

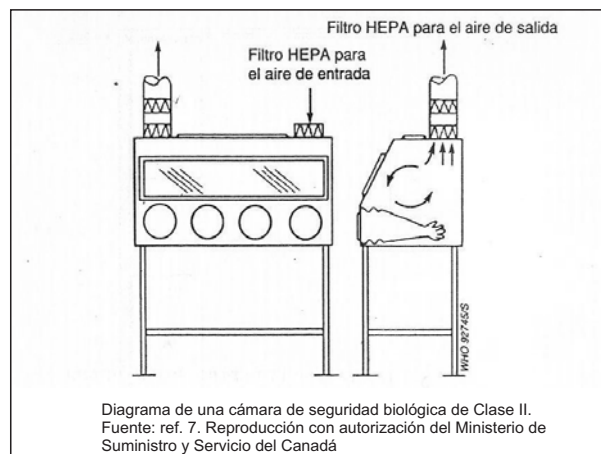
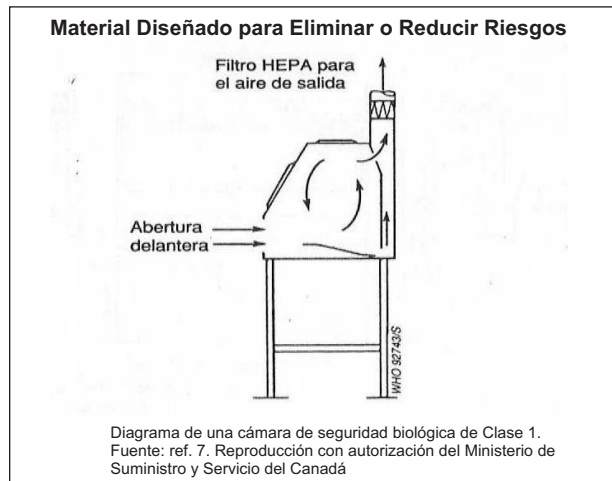
Se trató de solucionar ambos inconvenientes, el primero, mediante el uso de filtros absolutos y el segundo mediante un mecanismo que sirviera como autolimpiante del área (contaminación interior).

Para ello se hizo construir un laboratorio cuyo cielorraso estaba formado por filtros HEPA (High efficiency particulate air) y su piso formado íntegramente por una rejilla metálica suspendi-

da. El aire se hizo fluir uniformemente y a velocidad menor que la convencional a través de toda el área y hacia afuera de la misma a través del piso. Los recuentos de partículas dieron menos de 100 por pié cúbico.

Ventajas:

- Proveen aire limpio sin turbulencia
- Tienen capacidad autolimpiante
- Eliminan la contaminación cruzada (flujo vertical)
- Reducen los cuidados a que está sujeto el personal.
- Tienen menores costos de operación en cuanto a trabajos accesorios.



EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

MANEJO DE MATERIAL DE VIDRIO

Si el material no fue utilizado, una vez perfectamente limpio, es acondicionado, envuelto en papel o en cajas metálica diseñadas al efecto (para evitar la recontaminación hasta el momento del uso) y sometido a un proceso de esterilización, generalmente en estufas de esterilización (si nos interesa el material seco) o en autoclave.

Si fue utilizado, es necesario someterlo previamente a una esterilización en autoclave, proceso que se denomina "descontaminación". Luego se lo somete a una limpieza profunda, se enjuaga bien con agua potable, se lo desioniza con agua destilada (los restos de jabones o detergentes pueden ser inhibitorios del crecimiento de numerosos microorganismos), y se lo seca. El paso siguiente es similar a un material limpio.

MANEJO DE MATERIAL DE PLÁSTICO

Igual que en el caso anterior, si el material fue utilizado debe previamente descontaminarse, esterilizándolo en autoclave. Luego el proceso de limpieza y secado. Posteriormente se procede a esterilizarlo en autoclave.

Aún en el caso de utilizarse materiales descartables este debe ser descontaminado antes de ser desechado ya que no puede obviarse el riesgo de contaminación al exterior del laboratorio.

Hemos visto los aspectos generales y prácticos de la esterilización. Veamos ahora con una finalidad biológica algunos problemas que deben conocerse en este curso.

BIBLIOGRAFÍA

- Manual de Microbiología Clínica. Lennette y col. Ed. Méd. Panamericana. Ed 3ª, 1982.
- Microbiología. Zinsser y col. Ed. Méd. Panamericana. Ed 17ª, 1983.
- III Reunión Nacional de Normas para el Control de Infecciones Hospitalarias. Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara. 1995.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO:

- 1) Acondicionamiento y esterilización de material termoestable.

Cada alumno dispondrá de:

- a) Placas de Petri, pipetas, tubos, tubos de hemólisis, tubos de ensayo, talco, material metálico, aceites en general, etc. La esterilización se llevará a cabo por calor seco (170°C por 1 hora).
- b) Material de goma, medios de cultivos líquidos y soluciones termoeestables (según instrucciones del ayudante). La esterilización se llevará a cabo por calor húmedo (en autoclave a presión 1 atm por 15 minutos).

- 2) La esterilización por filtración de una solución termolábil será mostrativa.

- 3) Se realizará el control biológico del proceso de esterilización por calor húmedo.

Método

Rotular las ampollas de control conteniendo esporos de *B. stearothermophilus* en un medio de cultivo.

Ampolla N° 1 "Sin tratamiento" (control viabilidad de esporos).

Ampolla N° 2 "Calor húmedo" (121°C durante 15 minutos).

Incubar ambos a 55°C durante 48 horas.

Resultados

Primer caso: se realizó correctamente la esterilización.

En el Tubo N° 1 (sin tratamiento térmico) se observará un viraje del medio de cultivo al amarillo debido al desarrollo del microorganismo.

En el Tubo N° 2 permanecerá de color violeta.

Segundo caso: no se realizó correctamente la esterilización.

En las dos ampollas se produce el desarrollo del microorganismo con el consiguiente viraje del indicador de pH.

Nota: La falta de desarrollo en el control de viabilidad de esporos invalida la operación.

Medio de cultivo

Composición:

Peptona	0,50 %
Extracto de carne	0,30 %
Glucosa	1,00 %
Púrpura de bromocresol	(Indicador de pH)

TRABAJO PRÁCTICO Nº 2

MEDIOS DE CULTIVO

FUNDAMENTO TEORICO

Aunque las tendencias en microbiología clínica apuntan claramente hacia el desarrollo de métodos rápidos, independientes del crecimiento de los microorganismos, para determinar la presencia de agentes infecciosos, el aislamiento y la identificación de los patógenos viables son aún el “estándar” de oro para el diagnóstico actual de las enfermedades infecciosas.

MEDIOS ARTIFICIALES

El objetivo principal de preparar un medio de cultivo es proporcionar una mezcla equilibrada de todos los nutrientes requeridos, en concentraciones que permitan un buen crecimiento del microorganismo para el cual ha sido diseñado.

Es necesario disponer de una base mineral que proporcione todos los electrolitos en forma iónica, que pueden actuar como nutrientes y/o favorecedores de la actividad enzimática.

Este medio basal debe suplementarse con sustancias orgánicas que actúan como fuente de energía y/o una fuente de carbono más algún factor de crecimiento requerido. Estos suplementos variarán de acuerdo con las propiedades nutricionales particulares del organismo que se desea cultivar.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licua completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados.

Estos medios pueden promover el desarrollo de microorganismos solamente si se cumplen ciertos requisitos para el crecimiento, éstos incluyen:

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Los microorganismos mesófilos crecen en forma óptima entre 20 y 40 °C. Otros como los psicrófilos lo hacen a temperaturas entre 10 a 20 °C y en los termófilos la temperatura es de 50 a 60 °C. En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 35 °C, y los saprófitos tienen rangos más amplios.

CONDICIONES ADECUADAS DE HUMEDAD

La presencia de agua en el medio y en la atmósfera es indispensable para el crecimiento bacteriano.

CONCENTRACIÓN SALINA

La mayoría de los organismos crece bien en medios ordinarios. Otros como las bacterias halófilas requieren altas concentraciones salinas.

pH

La concentración de iones hidrógenos es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las bacterias se desarrollan en medios con un pH neutro, aunque las hay que requieren medios más o menos ácidos y otras, alcalinos.

Oxígeno

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal (*aerobios*). Los microorganismos *anaerobios estrictos* sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental y los que son *microaerófilos* crecen bien si la tensión de oxígeno es inferior a la que precisan los aerobios. Ciertos organismos (p.ej., los meningococos y gonococos), crecen mejor si la PCO_2 es algo superior a la del aire (*capnófilos*). Los *anaerobios facultativos* son capaces de crecer en condiciones aerobias o anaerobias.

CLASIFICACION DE MEDIOS DE CULTIVO

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

a) Según su estado físico

- líquidos
- sólidos
- semisólidos

b) Por su naturaleza

- naturales
- artificiales o sintéticos
- semisintéticos

c) Por su finalidad metabólica

- mínimos
- diferenciales
- enriquecidos
- selectivos
- de enriquecimiento

d) Por su uso

- pruebas bioquímicas
- recuento de bacterias
- especiales
- transporte
- medios de mantenimiento

a) Según su estado físico

Medios líquidos: permiten el crecimiento libre de los microorganismos con distribución y características que dependerán del germen o de las necesidades del usuario, de que sea estático o esté agitado permanentemente y de su relación con la fase gaseosa (oxígeno en general) u otra.

Medios sólidos: (Agar -agarosa) permiten el crecimiento de los microorganismos en el interior o en la superficie sólida o semisólida del medio que contacta directamente con la fase gaseosa. Los medios sólidos tienen de 1,5% a 2% de agar, en tanto los semisólidos tienen de 0,3 a 0,5% de agar.

b) Por su naturaleza

Medios naturales: son aquellos en los que todos sus componentes son sustancias biológicas de las cuales no se conoce su composición cuali ni cuantitativa.

Medios sintéticos: son aquellos de composición química conocida definida cuali y cuantitativamente.

Medios semisintéticos; son medios que contienen sustancias químicas en proporciones conocidas junto a productos de origen natural. Ej agar sangre, agar nutritivo, etc.

c) Por su finalidad metabólica

Medios mínimos: son aquellos que presentan en su composición la base mínima de nutrientes capaz de permitir el desarrollo de microorganismos.

Son de uso frecuente para el cultivo de microorganismos poco exigentes, también sirven de base para otros medios. Su composición es muy simple: contienen cloruro de sodio, extractos de carne (fuente de vitaminas y coenzimas), peptona (proteínas parcialmente hidrolizadas) y agua. Sirven para el desarrollo, aislamiento y conservación de microorganismos. Ejemplos: Caldo nutritivo (CN), Agar nutritivo (AN),

Agar tripteína-soya (ATS).

Medios diferenciales e indicadores: son aquellos que permiten determinar características metabólicas o marcadores genéticos de microorganismos, sin inhibir sus funciones fisiológicas. En estos se incluyen diversos colorantes e indicadores de pH y otros componentes, que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a identificar las bacterias aisladas. Estos medios no contienen sustancias inhibitorias.

Ejemplo: Agar-Cistina 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.

Desarrollan Enterobacterias, Pseudomonas, Enterococos y Estafilococos.

Medios enriquecidos: son aquellos que por el agregado de algunos componentes como sangre, suero, extractos de tejidos vegetales o animales al CN, AN, ATS, proveen al medio de nutrientes adicionales, que permiten el desarrollo de bacterias exigentes. Ejemplos

Agar Sangre: para su preparación se agrega sangre al 5% a un volumen de agar base estéril, fundido y enfriado a 50 °C. Desarrollan bacterias exigentes nutricionalmente y por supuesto las poco exigentes. Entre las primeras podemos mencionar a los Neumococos, Estreptococos, etc. Es además un medio de cultivo **diferencial** porque pone de manifiesto la acción de una hemolisina bacteriana que permite diferenciar especies hemolíticas de otras no hemolíticas. En las primeras se observa alrededor de las colonias la formación de dos tipos de halos:

- Uno transparente que denota una hemólisis total, que corresponde a las especies beta hemolíticas (Ejemplo: Estreptococos de grupo A, algunos del grupo D, etc.).
- Un halo de coloración verdosa o hemólisis parcial, que corresponde a las especies alfa hemolíticas (Ejemplo: Neumococos, Estreptococos no grupo A, etc.).
- A las especies no hemolíticas se las suele denominar gama hemolíticas o anhemolíticas.

En agar sangre se puede observar el clásico **fenómeno de satelitismo**:

Haemophilus influenzae es el agente etiológico más común de meningitis bacteriana aguda en los niños. La mayoría de las especies de *Haemophilus* requieren para su desarrollo ciertos factores de crecimiento como el factor X (hemina) y el factor V (NAD ó NADP). El factor X es empleado por los microorganismos para elaborar citocromo y otros pigmentos respiratorios aeróbicos. El factor V actúa como receptor intermediario de hidrógeno en los mecanismos respiratorios. Casi todas las bacterias son capaces de sintetizar ambos factores, excepto algunas como *Haemophilus influenzae* que no sintetizan el factor V.

El agar chocolate (que se describe a continuación) proporciona estos factores (X y V) necesarios para el crecimiento de estas especies de *Haemophilus*. El agar sangre tiene solamente el factor X (hemina), por lo tanto, para el crecimiento del *Haemophilus influenzae* es necesario el agregado del factor V.

Diversas bacterias, como el estafilococo, elaboran el factor V (NAD) como producto de su metabolismo. Si la muestra de la que se pretende aislar *Haemophilus influenzae* se inocula por estrías sobre una placa de agar sangre y luego con un ansa se realiza una única estría de un estafilococo hemolítico productor de factor V, atravesando el área donde se ha sembrado la muestra, luego de 18 a 24 horas de incubación, es posible observar las diminutas colonias de *Haemophilus* como gotas de rocío alrededor de las colonias hemolíticas de Estafilococos. Éste es el fenómeno conocido como “satelitismo”.

Agar Chocolate: en su preparación se agrega sangre al 5% a un volumen de agar base estéril, fundido y enfriado a 50 °C, la cual se calienta luego a 80°C, agitando (evitar espuma) hasta que aparece un color marrón. Con este calentamiento se han lisado los glóbulos rojos y liberados los dos factores: el factor X (hemina) y el factor V (NAD o NADP). El agar chocolate es un medio enriquecido ideal para el aislamiento de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*.

Se debe tener presente que algunos medios base son considerados medios enriquecidos sin ningún otro agregado, debido al alto contenido de nutrientes que poseen. Ejemplo: Caldo Infusión Cerebro-Corazón (ICC).

Medios selectivos: 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 aún cuando esté en menor proporción.

La adición de ciertas sustancias químicas al medio de cultivo, impide el desarrollo de algunas bacterias sin inhibir otras. Estos agentes selectivos son muy útiles para evidenciar la presencia de patógenos específicos en una muestra que contiene flora mixta, y para su posterior identificación.

Son utilizados como agentes selectivos: los colorantes: ejemplo: cristal violeta que inhibe bacterias Gram (+), verde brillante utilizado en medios altamente selectivos para

eliminar la flora acompañante, bacterias Gram (+) y Gram (-). El cloruro de sodio en altas concentraciones inhibe a casi todas las bacterias excepto las halófilas.

Otros agentes selectivos son: citrato de sodio, selenito de sodio, sales biliares (desoxicolato de sodio), etc.

También puede hacerse selectivo un medio ajustando la reacción a un **pH muy elevado o muy bajo**. Ej: pH 5,6 en el medio de Sabouraud (para hongos); pH 8,0-9,0 para el aislamiento de *Vibrio cholerae*.

Otro grupo de agentes selectivos son los **antimicrobianos**: vancomicina, trimetoprima, colistina, etc.

Los agentes reductores también se adicionan a los medios para hacerlos selectivos y promover el desarrollo de microorganismos anaerobios. Ejemplo: ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, cisteína, etc.

Dentro de los medios selectivos hay variación en cuanto a su poder inhibitorio; altamente selectivo, medianamente selectivo y ligeramente selectivo, etc.

Agar EMB (agar eosina-azul de metileno): es ligeramente selectivo y utilizado para el aislamiento de bacilos entéricos. Permite también la **diferenciación** de *Escherichia coli*, *Enterobacter* y otros microorganismos.

Los colorantes contenidos en su fórmula inhiben a muchos microorganismos acompañantes Gram (+). El medio contiene también lactosa que es degradada por las bacterias coliformes, el ácido producido por la degradación de este azúcar y la mezcla de los colorantes eosina y azul de metileno, produce el cambio de color de los mismos y su precipitación, tiñendo las colonias. Las de *E. coli*, lactosa (+), aparecen negro-verdosas con brillo metálico; las de *Enterobacter* spp, lactosa (+) con centro violeta o pardo oscuro y periferia violeta pálido sin brillo metálico. *Salmonella* spp y *Shigella* spp, que son lactosa (-), desarrollan colonias transparentes, ámbar hasta incoloras.

Agar Mc Conkey: es similar al anterior en su poder inhibitorio y contiene una mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe a microorganismos Gram (+); lactosa y rojo neutro como indicador de pH. El aumento de la acidez del medio por la acción fermentadora de las bacterias lactosa (+) produce una coloración roja en sus colonias; las bacterias no fermentadoras, lactosa (-), colonias incoloras.

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

Agar Manitol Salado: es utilizado para la demostración de estafilococos patógenos. La concentración extremadamente alta de cloruro de sodio (7,5%), permite el crecimiento de microorganismos tolerantes a la misma, entre los que se encuentran los del género *Staphylococcus*.

También contiene manitol, cuya degradación lleva a la formación de ácidos, sirve para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*. La acidez produce en el medio un cambio de color (de rojo a amarillo), por viraje del indicador rojo fenol. Las colonias de *S. aureus* tienen un crecimiento intenso, con formación de un halo amarillo luminoso por ser organismos manitol (+). *S. epidermidis* tiene un crecimiento débil casi siempre y no produce cambio de color manitol (-).

Agar Thayer Martin: con el agregado de una mezcla liofilizada de vancomicina, colistin, trimetoprima y nistatina, más aditivos estimulantes del crecimiento, es un medio ideal para el aislamiento selectivo de *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, porque inhibe la flora acompañante y las *Neisserias* saprófitas. Es un medio altamente selectivo.

Medios De Enriquecimiento: generalmente son caldos, destinados a promover el crecimiento de los microorganismos presentes. Ejemplo: CN.

Se debe tener en cuenta que los caldos también pueden clasificarse en selectivos, diferenciales, enriquecidos, etc, conforme al agregado de diferentes sustancias.

Caldos Selectivos de enriquecimiento: contienen agentes inhibidores; favorecen especialmente el crecimiento de microorganismos patógenos, que generalmente se encuentran en escaso número en las muestras. Ej: Caldo Selenito para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* y eventualmente *Shigella*, a partir de heces, orina, agua, alimentos, etc. El selenito inhibe el crecimiento de bacterias intestinales coliformes y enterococos, principalmente en las primeras seis horas de incubación y hasta 12 horas. *Proteus* y *Pseudomonas* no son inhibidos.

Caldos enriquecidos: el agregado de diferentes sustancias no inhibitorias como por ejemplo sangre al 5% a un caldo nutritivo transforma al medio de enriquecimiento en enriquecido.

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

d) Por su uso

Medios para pruebas bioquímicas: utilizados para la determinación de ciertas propiedades bioquímicas de los microorganismos que junto a otras características o marcadores genéticos, permiten su identificación (investigación de la degradación de azúcares, metabolismo proteico, metabolismo lipídico). Ej: citrato de Simmons, Agar fenilalanina.

Medios para recuentos de bacterias: se emplean para la determinación del número de bacterias contenidas en materiales tales como el agua, leche, productos lácteos. Ej: Plate Count Agar (PCA), en orina el Agar CLDE.

Medios especiales: son aquellos cuya fórmula constitutiva cumple las exigencias vitales de un determinado germen que sólo en ese medio halla las condiciones óptimas de desarrollo; ejemplo: medio Lowenstein-Jensen para micobacterias.

Medios de transporte: pueden ser líquidos o semisólidos. Mantienen viables los microorganismos durante un tiempo variable y son utilizados para la remisión de las muestras al laboratorio.

Cada uno de ellos trae especificaciones en cuanto a su preparación, tiempo de vida útil etc. Ejemplos: el medio de Stuart, el de Cary Blair, etc.

Medios de mantenimiento: son aquellos que permiten la viabilidad y multiplicación de los gérmenes si se mantienen las condiciones óptimas para el desarrollo. Ej: caldo tripticasa-soya más glicerina.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

DISOLUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DESHIDRATADO

Para la preparación de medios de cultivo se utiliza agua limpia, recién destilada o recién desmineralizada y cuya reacción sea la más cercana posible al pH neutro.

Los recipientes destinados a la preparación (por lo general matraces, erlenmeyer) se limpian escrupulosamente con el agua que se ha descrito en el párrafo anterior, con el fin de eliminar totalmente eventuales residuos de otras sustancias. Los recipientes destinados a la preparación de medios de cultivo deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad y concienzudamente. De ser posible, no se prepararán más de 1/2 litro por recipiente. Al medio de cultivo deshidratado y pesado se añade aproximadamente la mitad de la cantidad necesaria de agua y se agita suficientemente para conseguir una suspensión homogénea. Después se incorpora la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a la pared interna del recipiente.

Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario con la intención de facilitar la solubilidad.

Los medios nutritivos que no contienen agar ni gelatina se pueden disolver, por lo general, en agua fría o con un ligero calentamiento. A fin de obtener una preparación adecuada se recomienda hacer uso de estas indicaciones. Los medios nutritivos que contienen agar o gelatina deben ser calentados para conseguir su disolución. Este calentamiento se realiza en baño maría. En el caso de medios de cultivo que no deban ser sometidos a ulterior esterilización en autoclave, es imprescindible prestar atención a su disolución completa. Puede reconocerse que se ha alcanzado

este grado cuando, al agitar, no se adhiere a la pared interna del recipiente partícula alguna de agar y la solución viscosa, resbala libremente.

Ajuste del pH

El valor del pH depende mucho de la composición del medio de cultivo, de la temperatura que tenga este medio de cultivo en el momento de su medición y del tratamiento a que se haya sometido dicho medio de cultivo durante su obtención (disolverlo, esterilizarlo). Por este motivo, la medición del pH se hace después de la esterilización. Para realizar esta medida, lo mejor es utilizar un aparato medidor de pH ("peachímetro"). En los medios de cultivo sólidos, la medición del pH (y, eventualmente la corrección que fuese precisa) se realiza a 45-50°C (medio de cultivo líquido) y en los medios nutritivos líquidos se hace a temperatura ambiente.

El pH se ajusta al valor indicado para cada medio de cultivo. A la temperatura de incubación, el valor del pH quedará dentro de los límites de oscilación previstos. La corrección se logra por adición de solución 1N o 0,1N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio, a una muestra de medio de cultivo exactamente medida (por ejemplo, 50 ml.). La cantidad de solución correctora necesaria para la totalidad del producto preparado se calcula fácilmente a partir de la cantidad de solución correctora empleada para la muestra del medio de cultivo.

ESTERILIZACIÓN

Antes de su esterilización, y dentro de lo posible, es conveniente repartir el medio de cultivo en porciones más pequeñas, por ejemplo, en los recipientes definitivos o en los que ulteriormente se lleve a cabo el trabajo de investigación de que se trate (excepto placas de Petri).

Tras la esterilización y después de haber alcanzado el equilibrio de presiones (entre el interior y el exterior del autoclave) y para evitar la sobrecarga térmica del medio de cultivo, deben sacarse enseguida del autoclave.

Temperaturas más altas y calentamientos más prolongados de lo previsto perjudican la calidad del medio de cultivo. El autoclave es la forma de esterilización más segura para los medios de cultivo. Si no se dispone de autoclave, se puede utilizar una olla de presión grande de uso en la cocina.

Control de calidad

Control de esterilidad: ausencia de desarrollo después de una incubación de 18-24 hs a 35-37 °C, de algunas muestras tomadas al azar del medio de cultivo.

Control de calidad: cada nueva partida debe ser ensayada selectivamente con organismos de reserva de modo que se puedan observar los resultados esperados, tanto positivos como negativos.

Control de caducidad: verificar en todos los casos que el medio a utilizar no esté vencido observando la etiqueta del envase. Una vez preparado se puede conservar en heladera por un tiempo limitado.

Nota: Los medios de cultivo deben llevar un rótulo que indique claramente contenido y fecha de preparación

BIBLIOGRAFÍA

- LENNETTE, Edwin H. Manual de Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana.
- BAILEY-SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana.
- MAC FADDIN, J.F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Médica Panamericana.
- KONEMAN, Elmer W. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana.
- Manual Merck. Medios de Cultivo.
- Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos. BBL.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

Objetivos:

- 1- Se procederá a la evaluación de los medios de cultivo y su clasificación.
 - 2- Cada grupo de trabajo procederá a la preparación, distribución, esterilización y conservación de los medios de cultivo asignados.
- Caldo tripteína soya
 - Agar chocolate
 - Agar sangre
 - Agar EMB
 - Agar SS
 - Agar manitol salado
 - Agar tripteína soya
 - Agar CLDE

Materiales

- Tubos de ensayo
- Erlenmeyers
- Probetas.
- Algodones.
- Tiras de pH.
- Placas de Petri estériles.
- Pipetas de 10 ml y de 1 ml estériles.
- Varillas de vidrio.
- Sangre con anticoagulante (citrato de sodio al 4% o heparina).
- Agua destilada.
- Tapones de plástico, goma, etc.
- Balanza analítica.
- Recipiente para Baño de María.
- Solución de NaOH 1N.
- Solución de HCl 1N.
- Mechero y trípode.

Metodología de trabajo: todos los medios de cultivo y los medios base para la preparación de agar sangre y de agar chocolate, se prepararán con medios comerciales deshidratados en polvo o granulados, siguiendo las indicaciones de la etiqueta de cada envase y realizando el cálculo para pesar de acuerdo al volumen pedido.

Preparación de agar sangre

- Se prepara en erlenmeyer un volumen de medio Agar tripteína soya (ATS) según la cantidad de placas que sean necesarias.
- Se calienta el medio en baño maría a temperatura de ebullición hasta disolver completamente el agar.
- Se lleva a esterilizar en autoclave 15' a 121°C.
- Una vez estéril se deja enfriar el medio a una temperatura de 50°C (aproximadamente).
- Se agrega sangre en forma aséptica, 5-10% Con movimientos circulares se homogeniza suavemente, **SIN HACER ESPUMA**.
- Se distribuye asépticamente en placas de Petri de 10 cm de diámetro, la cantidad de 12 a 15 ml aproximadamente.
- Se deja solidificar el medio a temperatura ambiente.
- Se ponen las placas en estufa de 37°C por 20 minutos para eliminar el agua de condensación que se forma en la superficie del medio y en la cara interna de las tapas. Las placas se colocan abiertas con las bases invertidas.

Preparación de agar Chocolate

- Al agar sangre recién preparado se lo somete a un calentamiento de 80 °C a baño maría, agitando por rotación suave hasta que el medio se torne de un color marrón chocolate. No deben formarse grumos, ni burbujas y la apariencia debe ser homogénea.
- Se distribuyen asépticamente 15 ml de medio en placas estériles.
- Se deja solidificar el medio a temperatura ambiente.
- Se llevan las placas a estufa de 37°C por 20 minutos aproximadamente para su secado en la misma forma del agar sangre.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

MICROSCOPIA: EXAMEN EN FRESCO

FUNDAMENTO TEORICO

A pesar de disponer de métodos rápidos de diagnóstico, muchos de los cuales requieren instrumentos sofisticados o reactivos inmunológicos, la simple observación visual de una muestra para análisis microbiano, es la forma más rápida de apoyo al diagnóstico clínico. Muchos agentes infecciosos pueden ser identificados en forma presuntiva, y también confiable, con unas pocas coloraciones y un microscopio con buena óptica resolutive.

Leeuwenhoek realizó sus observaciones hacia fines del siglo XVII; hasta entonces sólo se podía especular acerca de la existencia de agentes infecciosos más pequeños que lo que el ojo humano podía distinguir. Desde ese momento, el microscopio óptico se ha transformado en uno de los medios más importantes para el diagnóstico de las infecciones.

Toda muestra que entra al laboratorio de microbiología debe examinarse visualmente en forma macro y microscópica para evaluar su calidad y adecuar los procedimientos a seguir.

EXAMEN DIRECTO DE LAS MUESTRAS:

EXAMEN MACROSCÓPICO

El examen macroscópico de la muestra ofrece inmediata información de importancia: si la muestra ha sido recogida correctamente, si hay cantidad suficiente de material, si el recipiente es adecuado, si hubo excesiva demora en el envío, y de ser necesario (si no se cumplen las condiciones), debe solicitarse una segunda toma de muestra.

Los caracteres macroscópicos a observar como color, olor, aspecto, apariencia purulenta, presencia de gas, gránulos, etc., pueden darnos pistas valiosas en cuanto a la naturaleza y calidad de las muestras recogidas. Por ejemplo:

En pacientes con meningitis el aspecto turbio del LCR es a menudo la primera confirmación del diagnóstico.

Es posible por el color, consistencia y olor, saber si la muestra es un esputo correctamente recolectado o simplemente saliva.

La observación a simple vista de moco y sangre en heces, ayuda al médico a pensar en enfermedades inflamatorias del intestino.

El olor fétido de la mayoría de las bacterias anaerobias o el olor a fruta y color verdoso de la *Pseudomonas aeruginosa* son importantes indicios diagnósticos tempranos.

EXAMEN MICROSCÓPICO

El examen microscópico de la muestra puede realizarse **en fresco**, es decir con el material clínico que permita observar los microorganismos en estado vivo, en preparaciones directas o levemente modificadas, y **con el material fijado y coloreado**.

El examen microscópico directo de distintos tipos de células, bacterias, micelios, levaduras, estructuras parasitarias, cristales, granos de almidón, glóbulos de grasas, etc. pueden proveer información para formular un diagnóstico presuntivo.

EXAMEN EN FRESCO

Las muestras que generalmente se observan primero en fresco son: *sedimento urinario, flujo vaginal, exudado uretral, esperma, heces, esputo, exudados de lesiones, líquido de aspiraciones*, etc.

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 la puede conservar, sellando los bordes con esmalte para uñas o mezcla parafina-vaselina (Vaspar).

Para observar estas preparaciones y otras con algunas modificaciones, se utiliza microscopio de campo claro o de contraste de fase. El objetivo que se utiliza para la observación es de 10x, 20x, o 40x.

Las preparaciones húmedas se emplean para detectar huevos, quistes, trofozoítos móviles de parásitos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolítica*, *Trichomonas vaginalis*, células de distintos tipos, elementos fúngicos, etc. 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 distintas técnicas utilizadas en un examen microscópico directo son:

- 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.

PREPARACIONES DIRECTAS LEVEMENTE MODIFICADAS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

MONTAJE EN SOLUCION SALINA

OBJETIVO

Observar: Huevos, quistes, larvas, trofozoítos, movilidad de parásitos, elementos fúngicos, etc.



TÉCNICA

Sobre un portaobjeto suspender en una gota de solución fisiológica una pequeña cantidad de muestra. Colocar un cubreobjeto y examinar al microscopio con objetivo de 10x y 40 x. Ubicar el condensador para reducir la cantidad de luz transmitida.

MONTAJE EN IODO

OBJETIVO

Diferenciar los quistes de parásitos de los leucocitos del huésped, en los preparados en fresco de materia fecal. Los quistes se tiñen con el yodo y toman un color pardo claro.



TÉCNICA

Suspender sobre un portaobjeto en una gota de solución de yodo, una pequeña cantidad de materia fecal y colocar un cubreobjeto.

Examinar al microscopio en 10x y 40x

MONTAJE EN HIDROXIDO DE POTASIO

OBJETIVO

Detectar elementos fúngicos en muestras que contienen queratina (piel, pelo, uña).

El álcali digiere parcialmente los componentes proteicos de la célula huésped, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos.



TÉCNICA

Suspender en una gota de KOH al 10 % escamas de piel, pelo o uñas.

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.

Examinar al microscopio

p/ detectar hifas/esporos en 40x.

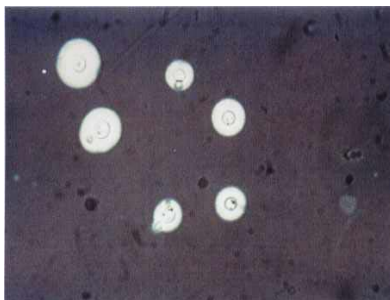
Puede agregarse azul de lactofenol al KOH para facilitar la visualización de los hongos.

TÉCNICA DE LA TINTA CHINA

OBJETIVO

Observar células levaduriformes capsuladas. Los polisacáridos capsulares rechazan las partículas de tinta y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos.

Ej. cápsula de *Cryptococcus neoformans* en líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras secreciones.



TÉCNICA

Centrifugar el LCR para concentrar los microorganismos en el sedimento.

-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.

-Evaluar al microscopio con objetivo de 10x para "screening" y con 40x para confirmar la presencia de microorganismos capsulados sospechosos.

EXAMEN FONDO OSCURO

OBJETIVO

Visualizar ciertas bacterias delgadas que son invisibles en preparaciones directas. Sin embargo su movilidad característica permite su identificación presuntiva

Especialmente útil para detectar espiroquetas tales como *Borrelia* y *Treponemas*.

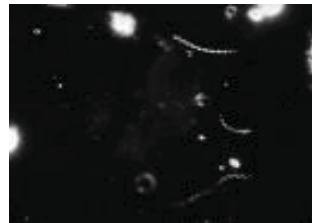
El microscopio de campo oscuro permite captar mejor la luz reflejada por los espejos y refractada por la superficie de los objetos, los cuales aparecen brillantes sobre un fondo oscuro. Se bloquea la luz proveniente de la lámpara del microscopio con un círculo central que deja solo un anillo luminoso cuyos rayos llegan al objeto con un ángulo muy agudo. La luz se refleja y dispersa alrededor de los bordes del objeto y se visualiza a través del objetivo.

TÉCNICA

Se recoge una pequeña porción del material sobre un portaobjeto. Colocar un cubreobjeto. Agregar una gota de aceite de inmersión sobre la superficie de la lente del condensador de campo oscuro, que luego se alza hasta que el aceite se ponga en contacto con la parte inferior del portaobjeto. Esto es para controlar la dirección de la luz y evitar su dispersión.

Examinar con objetivo de 40x.

Las espiroquetas aparecen como "tirabuzones" móviles y brillantes sobre un fondo negro.



TÉCNICA DE LA GOTA PENDIENTE

OBJETIVO

Se realiza en portaobjetos excavados. Persigue el mismo propósito que el montaje con solución fisiológica, salvo que hay menor distorsión porque el peso del cubreobjeto no influye.

Se usa generalmente para estudiar movilidad de bacterias.

TÉCNICA

Colocar una pequeña cantidad de Vaspar alrededor del borde de la concavidad de la superficie superior de un portaobjeto de gota pendiente.

En el centro del cubreobjeto, suspender la colonia bacteriana en una gota de solución 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.

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. 1991.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

Observaciones en Fresco: siguiendo las instrucciones del instructor se tomará una ansada de las distintas muestras problema. Se realizarán preparados de orina, materia fecal, flujo vaginal, raspados de piel, uñas, pelos y de cultivos desarrollados en medios sólidos y líquidos.

- Si es una muestra líquida, depositar una gota con el ansa sobre el portaobjetos y colocar el cubreobjetos. Observar al microscopio en 10x, y en 40x. Dibujar.
- Si la muestra es sólida, previamente se deberá colocar una pequeña gota de solución fisiológica con el ansa y seguir el procedimiento de preparación del extendido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 4

MICROSCOPIA: COLORACIÓN DE GRAM

FUNDAMENTO TEORICO

Las bacterias y otros microorganismos son pequeños y transparentes (el índice de refracción de su protoplasma es muy cercano al del agua), y ello dificulta el estudio de los detalles morfológicos cuando se los examina en su estado natural. Es necesario entonces realizar coloraciones para visualizarlos adecuadamente.

Las tinciones se realizan con soluciones acuosas y no acuosas de colorantes o grupos de colorantes que dan una variedad de colores a los microorganismos.

Cuando se trata de realizar coloraciones a partir de microorganismos de cultivo, se aconseja utilizar cultivos jóvenes. Las células viejas pierden su afinidad para la mayoría de los colorantes.

Las coloraciones pueden ser:

- **Simples:** consisten en el agregado de un colorante que sirve para delinear la morfología, pero todas las estructuras adquieren la misma tonalidad.
- **Diferenciales:** éstas emplean más de un colorante en pasos sucesivos y las estructuras teñidas se diferencian tanto por el color como por la forma.

Las coloraciones más usadas en microbiología, aunque no las únicas son:

- Coloración de Gram
- Coloración de Ziehl-Neelsen
- Coloración con azul de metileno
- Coloración de Wrigth-Giemsa
- Coloración de Gueguen
- Coloración con colorantes fluorocrómicos

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

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

- 1- Recoger por medio de un ansa o hisopo el material a teñir y extender sobre un portaobjeto limpio y desengrasado, hasta formar una película. Si se parte de una colonia de un cultivo se suspende sobre una gota de solución fisiológica 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 fijarlo por medio del calor pasando el reverso del portaobjeto tres veces por la zona azul de la llama de un mechero Bunsen para que las células se adhieran al portaobjetos. Evitar el recalentamiento porque podemos deteriorar la muestra.
- 4- Dejar enfriar el portaobjetos antes de colorear.
- 5- Cuando se va a examinar varias muestras por medio de un método de tinción de rutina, como la coloración de Gram, pueden realizarse varios extendidos en un mismo portaobjeto, en secciones demarcadas previamente con un lápiz graso.

COLORACIÓN DE GRAM

Esta coloración ideada por Hans Christian Gram a fines del siglo XIX, permite dividir a las especies bacterianas en dos grandes grupos:

- **Gram positivas o Gram (+):** aquellas que retienen el colorante básico cristal violeta.
- **Gram negativas o Gram (-):** las que no retienen el cristal violeta y son decoloradas con alcohol - acetona.

El procedimiento clásico de la coloración de Gram incluye varios pasos:

- **Primer paso:** luego de la fijación del material por el calor de la llama, consiste en la aplicación de cristal violeta o violeta de genciana (se usan indistintamente como colorantes primarios en esta coloración).
- **Segundo paso:** se agrega solución de yodo (lugol), que actúa como mordiente y fija químicamente el colorante alcalino a la pared bacteriana. Todas las bacterias toman el color púrpura.
- **Tercer paso:** decoloración con alcohol - acetona, este es el paso fundamental de la coloración de Gram, ya que permite distinguir los gérmenes Gram (+) de los Gram (-), y debe realizarse con cuidado especial. En este paso las bacterias Gram (+) retienen el cristal violeta y las Gram (-) lo pierden.
- **Cuarto paso:** se agrega el colorante de contraste, safranina o fucsina, que teñirá a las bacterias Gram (-) de color rosado.

FUNDAMENTO DE LA COLORACIÓN DE GRAM

La composición química y la permeabilidad de la pared celular de las bacterias, las distintas solubilidades de los complejos y compuestos formados, intervienen en la diferenciación de Gram.

Es probable que por el mayor contenido en lípidos de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas, el alcohol o la acetona aumenten la permeabilidad de la pared y el colorante sea eliminado. Además, la presencia de un mayor número de residuos de ácido teicoico con uniones cruzadas en las bacterias Gram positivas, favorece posiblemente la fijación del cristal violeta.

El yodo, que penetra en ambos tipos de células bacterianas, forma un complejo colorante - yodo - proteína, que en las Gram negativas puede escapar fácilmente al exterior, si no está químicamente fijado. Esto no ocurre en las Gram positivas donde el alcohol atraviesa con dificultad las capas bacterianas debido a la deshidratación que produce y que reduce los poros de la pared.

Esta teoría se reafirma al observar que los microorganismos Gram positivos que han perdido la integridad de su pared celular debido a un tratamiento con antibióticos, envejecimiento o acción de enzimas autolíticas permiten el escape del violeta cristal en la etapa de decoloración.

TÉCNICA DE LA TINCIÓN DE GRAM

- 1- Con un ansa estéril (o un hisopo), 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 2 o 3 veces por la llama azul del mechero Bunsen. Dejar enfriar.
- 3- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- 4- Luego de 30 segundos de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua.

- 5- Cubrir el preparado con iodo de Gram durante 30 segundos. Lavar nuevamente con agua.
- 6- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas de decolorante acetona-alcohol 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 fucsina o safranina durante 30 segundos. Lavar con agua corriente.
- 8- Colocar el preparado en un soporte de tinción en posición vertical, dejando que escurra el exceso de agua y se seque el extendido.
- 9- Examinar el preparado al microscopio con objetivo de 100x de inmersión (en aceite). Las bacterias Gram positivas se tiñen de color púrpura o violeta y las bacterias Gram negativas aparecen rojo-rosadas.

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 o muy decolorado.
- 2- Con poco aumento, evaluar la conveniencia del espécimen:
 - Una señal de infección bacteriana aguda es la presencia de leucocitos polimorfonucleares.
 - La ausencia de leucocitos 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. Esta estrategia es útil, sobre todo cuando se observa un esputo que a menudo contiene saliva contaminante.
 - Con poco aumento, en general es posible diferenciar los leucocitos de las células epiteliales y esto permite al observador concentrarse en áreas con predominio de células inflamatorias.
- 3- Mediante la lente de inmersión en aceite, ***evaluar la técnica de la coloración.***
 - Se puede evaluar con rapidez si la coloración está bien realizada comparando diferentes áreas del portaobjeto (con lente de inmersión en aceite). Los núcleos de los leucocitos y las bacterias Gram negativas, que se observan en un área delgada del frotis, deberán colorearse de rosado o rojo, y las Gram positivas de púrpura. El hallazgo de bacterias rosadas próximas a elementos celulares ligeramente purpúreos (decoloración marginal) en una parte más gruesa del frotis, confirmará que se encuentran organismos Gram negativos y que no son bacterias Gram positivas decoloradas en exceso.
 - Puede controlarse la técnica de coloración de Gram coloreando una muestra de flora bucal por ejemplo, que contiene microorganismos Gram negativos y Gram positivos y células epiteliales.
 - Si el frotis coloreado con el Gram es técnicamente inadecuado, hacer uno nuevo y volver a colorearlo.

La mayoría de los errores de interpretación de los frotis coloreados con el Gram se deben a errores en la preparación del extendido: si es demasiado grueso, si la fijación por el calor fue excesiva se puede alterar la morfología normal de las bacterias y células, si la decoloración es escasa o excesiva, etc.

Fig. 2-3. Método de coloración de Gram.

Ideal

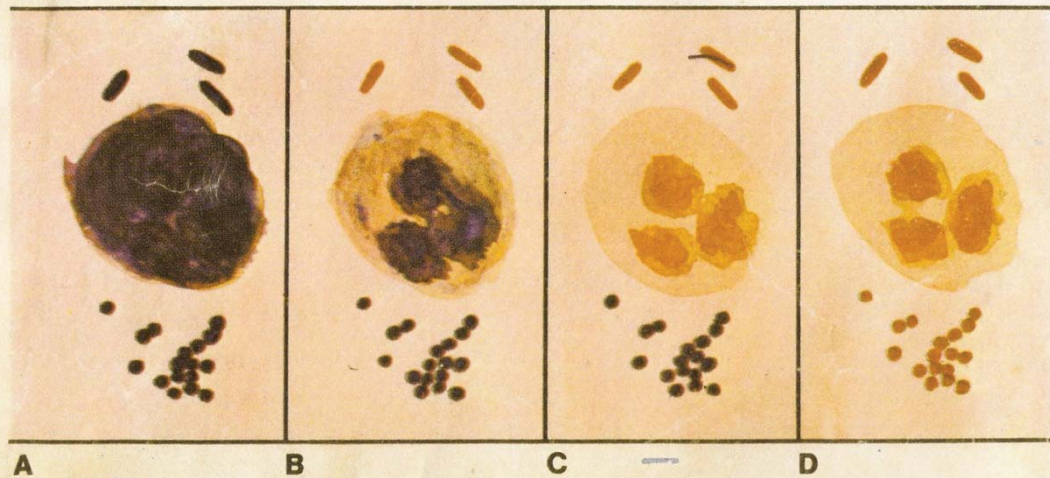


Fig. 2-4. Posibles variaciones de una coloración con el Gram ideal.

Precauciones:

- *Cuidado con los artefactos* El material Gram positivo de forma irregular es precipitado de ordinario por la coloración de Gram más que los cocos Gram positivos.
- *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.
- *Examinar el fondo.* Allí pueden esconderse bacterias Gram negativas difíciles de observar como *Nocardias*.
- *Examinar varias áreas del frotis.* Aun cuando los organismos vistos en la primera observación pueden confirmar nuestras sospechas.
- *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.
- *Tratar de hallar más de uno de los elementos observados antes de sacar conclusiones.* Aunque los microorganismos hallados 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.

Limitaciones de la Coloración de Gram

- No constituye un método para cápsulas, esporas, micobacterias u hongos en general (las levaduras aparecen como estructuras Gram positivas).
- Esta coloración puede proporcionar indicios de la presencia de cápsulas o esporas, pero deberán usarse otros medios de coloración más específicos para destacar estas estructuras.
- Las micobacterias no captan la coloración de Gram, si hay sospecha de ello proceder a una coloración acidorresistente.

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. 1991.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

COLORANTES DE GRAM:

1- Cristal violeta (de Hudcker):

Solución A

- Cristal violeta 20,0 gr
- Etanol 200,0 ml

Mezclar y disolver

Solución B

- Oxalato de NH_4 0,8 gr
- Agua destilada 80,0 ml

Mezclar y disolver

Agregar la solución A a la Solución B. Reposar durante 24 horas y filtrar antes de su empleo.

2- Solución de Lugol:

- Ioduro de potasio 2,0 gr
- Iodo (cristales) 1,0 gr
- Agua destilada 200,0 ml

Luego de disolver, filtrar y guardar en un frasco color caramelo a resguardo de la luz. Des-echarlo cuando el color comienza a aclararse.

3- Solución decolorante:

- Acetona 100,0 ml
- Alcohol de 95° 400,0 ml

4- Solución de Fucsina básica:

- Fucsina básica 1,0 gr
- Alcohol 10,0 ml
- Fenol 5 ml
- Agua 100 ml

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

Solución de safranina:

- Safranina 2,5 gr
- Alcohol 95% 200 ml

Técnica:

Siguiendo las instrucciones del instructor, preparar los extendidos rotulando convenientemente cada uno de los portaobjetos.

- 1- Dejar secar al aire y fijar a la llama mediante tres pasajes ligeros sobre ella.
- 2- Cubrir con cristal violeta de genciana. Dejar actuar 30 segundos.
- 3- Lavar con agua de canilla.

- 4- Cubrir con lugol. Dejar actuar 30 segundos.
- 5- Lavar con agua de canilla.
- 6- Decolorar con alcohol - acetona.
- 7- Lavar con agua de canilla.
- 8- Cubrir con fucsina básica (diluida al décimo). Dejar actuar 30 segundos.
- 9- Lavar con agua.
- 10- Secar y observar al microscopio con objetivo 100x con aceite de inmersión.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 5

MICROSCOPIA: COLORACIÓN DE ZIEHL- NEELSEN

FUNDAMENTO TEORICO

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, otras micobacterias y ciertos parásitos. Las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias 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 coloreados, estos microorganismos resisten el tratamiento siguiente con alcohol ácido, mientras que la mayoría de las demás bacterias pierde su coloración.

Las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, parásitos coccideos como *Cryptosporidium* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia, son difíciles de colorear y, una vez logrado esto, no se decoloran con facilidad.

Una de las características químicas más sorprendentes de las micobacterias es su elevado contenido en lípidos. Entre los componentes lipídicos que se extraen con disolventes orgánicos neutros están las ceras (ésteres de ácidos grasos más alcoholes) y los glucolípidos. Dentro de los distintos ácidos grasos que componen los lípidos de las micobacterias, el ácido micólico es típico de estos microorganismos.

FUNDAMENTO DE LA COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

El fenol, que forma parte del colorante, es soluble en lípidos, y éstos son componentes importantes de las bacterias ácido alcohol resistentes. El calentamiento favorece tal solubilidad y por lo tanto su penetración en la micobacteria. El fenol también es soluble en alcohol y agua, aunque en menor grado que en los lípidos.

El fenol con la fucsina forma 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 el FC se fijará fuertemente y coloreará de rojo la bacteria.

En el segundo paso de la técnica, el alcohol-ácido debido a la permeabilidad especial de la membrana citoplasmática, penetran con dificultad y se encuentran con el compuesto FC. El fenol se encuentra frente a 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, con 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 resumen, 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 decolorantes.

Técnica de la Coloración de Ziehl-Neelsen:

Luego de la fijación del extendido por el calor, en el primer paso, se agrega el colorante primario, la carbolfucsina, hasta cubrir el extendido. Luego se pasa una llama por debajo, hasta observar desprendimientos de vapores blancos de la solución colorante. En el transcurso de 5 minutos pasar tres veces la llama por debajo del extendido (no hervir ni deshidratar). Enjuagar con agua.

Para que el colorante penetre a través de la pared celular de los bacilos ácido - alcohol resistente, se requiere un tratamiento físico violento, que puede ser calor o un detergente tensioactivo.

- En la técnica convencional de Ziehl - Neelsen (ZN) se usa el calor.
- La técnica de Kinyou se realiza en frío, empleando tergitol como elemento tensioactivo que se añade al colorante.

- El colorante usado en la técnica de ZN es Triamino trifenil metano (carbolfucsina) y se trata de una mezcla de tres colorantes: Trifenil metano, Rosa anilina y Pararosanilina en fenol acuoso al 5%. El colorante se combina con el ácido micólico de la pared celular de las micobacterias.

En el segundo paso decolorar completamente con alcohol-ácido hasta que no aparezca color en el líquido de lavado. Enjuagar con agua.

Tercer paso: para la coloración de fondo se utiliza un colorante de contraste como el azul de metileno o verde de malaquita. Enjuagar con agua, dejar secar al aire. Observar con lente de inmersión en aceite.

Los bacilos acidorresistentes 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).

EXAMEN DEL EXTENDIDO TRATADO CON COLORACIÓN ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE

1- Con lente de inmersión en aceite (100x), los bacilos ácido alcohol resistentes como el *Mycobacterium tuberculosis* se observan típicamente como bastoncillos delgados, apenas curvos, que se tiñen de rojo.

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

3- Se debe poner especial cuidado para evitar la transferencia de bacilos ácido alcohol resistentes por la lente del microscopio, el aceite o el colorante, de un portaobjetos a otro.

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- Solamente los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) se teñirán de rojo; el fondo, los elementos celulares y células que no son ácido resistentes tomarán el color del colorante de contraste (azul o verde).

CÓMO INFORMAR EL RESULTADO

Esta tinción de los BAAR, junto con su característica forma y tamaño, son una valiosa ayuda para la detección precoz de la infección y el control de la terapia antimicrobiana. La presencia de BAAR en el esputo, combinada con una historia de tos, pérdida de peso y una radiografía de tórax que muestra un infiltrado pulmonar, es evidencia de una tuberculosis activa.

Se ha estimado que se requieren unos 10.000 bacilos /ml de esputo para que se evidencien al microscopio. Los pacientes con tuberculosis eliminan gran número de micobacterias y existe buena correlación entre un cultivo y un extendido positivo.

Estas tinciones (baciloscopías) también sirven para seguir la respuesta del paciente al tratamiento. En el curso del tratamiento los cultivos se negativizan antes que las baciloscopías, que siguen siendo positivas por la presencia de bacilos muertos que el paciente elimina. La disminución de bacilos en la baciloscopía indica que el tratamiento es efectivo. Caso contrario indicaría resistencia a la droga, mal tratamiento, tratamiento sin cumplir, etc.

Todo lo anteriormente expresado justifica la importancia de cómo se debe informar el resultado cuando se realiza una baciloscopía.

Por ejemplo en Tuberculosis se informa:

- (-) No se observa ningún BAAR en 200 campos microscópicos observados (con 100x)
- (+) Se observa menos de 1 BAAR en 100 campos microscópicos observados (con 100x)
- (++) Se observa de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos microscópicos observados (con 100x)
- (+++)

Cabe aclarar aquí que esta técnica de tinción es utilizada también en otras patologías (como lepra) y el informe de los resultados está normatizado según los programas de control de cada caso.

TINCIÓN CON COLORANTES FLUOROCRÓMICOS

Los colorantes fluorocrómicos como auramina y rodamina tiñen selectivamente la pared de las micobacterias, combinándose con el ácido micólico y produciendo un brillo verde o amarillo verdoso cuando se las observa en un microscopio de fluorescencia.

Las tinciones fluorocrómicas se observan con una fuente de luz intensa, que puede proporcionarla una lámpara de gas mercurio de 200 vatios o con una fuente de luz azul y un filtro de isotiocianato de fluoresceína.

Las bacterias teñidas con fluorocromo se ven de color amarillo brillante contra un fondo oscuro. Cuando se usa también rodamina las células toman un aspecto dorado. Puede usarse el naranja de acridina como contracolorante que da al fondo color rojo a naranja.

Los colorantes fluorocrómicos permiten examinar mucho más rápido los extendidos porque además de ser una técnica muy sensible, permite hacer un screening de los preparados con un objetivo de 25x, abarcando así un amplio campo y al mismo tiempo, favorecido por el contraste, la diferenciación morfológica de los elementos fluorescentes es más notable.

Algunos investigadores usan estas técnicas fluorocrómicas sencillas, con fines exploratorios y confirman con el método de Ziehl - Neelsen.

COLORACIÓN CON AZUL DE METILENO

Es una coloración simple, muy útil para visualizar la morfología de los microorganismos y comúnmente empleada para demostrar los gránulos metacromáticos del *Corynebacterium diphtheriae*.

Cuando es difícil hallar microorganismos Gram negativos en un frotis coloreado con Gram, por el escaso contraste con el fondo o por su localización intracelular (como ocurre en las infecciones meningocóccicas), es útil realizar una coloración con azul de metileno.

También es utilizada para el examen microscópico de leucocitos en heces diarreicas. La presencia de leucocitos fecales en pacientes con diarrea aguda tiene buena correlación con las enfermedades intestinales inflamatorias y permite la diferenciación de las patologías invasoras

(por *Shigella spp.*, algunas *E. coli.*) de las enfermedades no invasoras como Salmonelosis, las producidas por bacterias que elaboran toxinas, y por agentes virales.

COLORANTES DE GIEMSA Y WRIGHT

Son modificaciones del colorante de Romanowsky, que es una combinación de azul de metileno y eosina. El colorante de Giemsa tiene la ventaja de su mayor contraste, pero como su pH y la duración de la coloración deben controlarse con rigor, preparando todos los días el colorante para su uso, es más conveniente como método de trabajo diario usar el colorante de Wright, aunque también su pH es crítico.

Puede utilizarse para colorear microorganismos intracelulares y extracelulares en frotis de sangre, frotis por impresión y cortes de tejidos.

El colorante de Giemsa se usa sobre todo para detectar *Rickettsias*, *Chlamidias*, ciertos parásitos (por ejemplo los del paludismo) y para algunos hongos (como Histoplasma). Las Rickettsias y las Chlamidias se tiñen de azul a púrpura y los protozoarios tienen núcleo púrpura rojizo y citoplasma azul pálido o rosa azulado.

Estos colorantes tienen particular valor para la diferenciación de tipos de células inflamatorias. La demostración de células gigantes multinucleadas por medio del colorante de Giemsa o de Wright, en frotis preparados con material obtenido de la base de una ampolla cutánea (preparados de Tzanck), es índice diagnóstico de infección por virus del Herpes simple o varicela - zóster.

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. 1991.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

COLORANTES DE LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN:

Solución N°1: Fucsina fenicada

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

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

Solución N°2: Decolorante alcohol - ácido

Alcohol 95°	485 ml
Ácido clorhídrico puro	15 ml

Solución N°3: Solución d Azul de metileno al 0,3 gr %

TÉCNICA:

1- Con las precauciones dadas por el instructor, colocar sobre la mesada de trabajo un papel embebido en fenol. Tomar un portaobjetos limpio, desengrasado, sin rayaduras (nuevo si es posible), y frente a un mechero con ansa estéril y enfriada, tomar una ansada de esputo (previa

homogeneización y tratando de utilizar lo más espeso o consistente de la muestra) y depositar en el porta. Luego introducir el ansa en un frasco con arena y alcohol y finalmente esterilizarlo a la llama.

2- Luego de secar y fijar el extendido a la llama, ponerlo sobre la bandeja de coloraciones. Agregar la fucsina de manera de cubrir todo el preparado y con un hisopo embebido en alcohol calentar por debajo el porta hasta desprendimiento de vapores blancos. En ese momento suspender el calentamiento, dejar un minuto y volver a calentar. Repetir este procedimiento tres veces con la precaución de no secar el preparado y evitando la ebullición. (Esto demanda aproximadamente 5 minutos). Luego lavar con agua.

3- Decolorar con alcohol - ácido hasta que no aparezca color en el líquido de lavado. Si es necesario repetir la decoloración hasta observar a trasluz la presencia de coloración rosado tenue en las partes gruesas del preparado y blanco o transparente las partes delgadas del mismo.

4- Cubrir con el colorante de contraste durante un minuto. Lavar con agua. Dejar secar al aire y observar con objetivo 100x de inmersión en aceite.

COLORANTES TÉCNICA AZUL DE METILENO

Composición del colorante:

azul de metileno	0,3 gr
Alcohol etílico al 95%	30 ml
Agua	100 ml

Técnica:

- 1- Preparar un extendido fino, secarlo al aire, fijar al calor de la llama.
- 2- Cubrir el preparado con azul de metileno durante 30 - 60 segundos.
- 3- Lavar con agua.
- 4- Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x)
- 5- Dibujar

COLORANTES TÉCNICA DE GIEMSA Y WRIGHT

Composición del colorante:

- Colorante Giemsa	15 ml
- Agua destilada	100 ml

TÉCNICA:

- 1- Preparar un extendido sobre un portaobjetos limpio.
- 2- Dejar secar al aire
- 3- Bañar con alcohol metílico durante 1 minuto
- 4- Escurrir el alcohol y dejar secar
- 5- Cubrir la película con colorante de Giemsa y dejar 1 minuto
- 6- Agregar 30 gotas de agua destilada, continuar la coloración por 5 minutos. Escurrir.
- 7- Lavar con agua destilada
- 8- Apartar el portaobjetos y dejar secar al aire
- 9- Observar al microscopio con objetivo 40x y 100x (con aceite de inmersión)
- 10- Dibujar

TRABAJO PRÁCTICO Nº 6

TÉCNICAS DE SIEMBRA, AISLAMIENTO Y RECuento DE GERMENES AEROBIOS

FUNDAMENTO TEÓRICO

Antes de proceder a su cultivo, toda muestra debe ser examinada en sus características macroscópicas y microscópicas a fin de determinar si han sido adecuados los procedimientos de recolección y remisión de la misma. Una correcta recolección es una de las etapas más importante en el aislamiento de un microorganismo.

Es fundamental recoger el material en el sitio en que es más probable el hallazgo del microorganismo sospechoso, asegurando en todo lo posible un mínimo de contaminación, debiendo utilizarse recipientes estériles y adecuados.

Las muestras deberán ser de cantidad suficiente como para permitir un análisis completo y ser remitidas lo más pronto posible.

La mayoría de las muestras que no puedan ser analizadas en el momento deben conservarse en refrigeración a 4°-6°C. Hay muestras como el L.C.R. que debe conservarse a 37°C, **Nunca se refrigera.**

En algunos casos, cuando existe una importante demora entre la recolección y el cultivo de las muestras, deben utilizarse los denominados medios de transporte destinados a prolongar la supervivencia de los microorganismos.

TÉCNICAS DE SIEMBRA

1- SIEMBRA O INOCULACIÓN PRIMARIA: SIEMBRA EN PLACAS PARA AISLAMIENTO

Para lograr la identificación de un microorganismo, es indispensable trabajar con cultivos puros. Un cultivo puro consiste en el crecimiento de una sola especie bacteriana en un medio de cultivo. Cuando dos o más microorganismos crecen juntos estamos frente a un cultivo mixto.

Las muestras que llegan al laboratorio microbiológico contienen casi invariablemente más de un microorganismo. En consecuencia, deben sembrarse en medios de cultivo que ofrezcan una gran superficie, a los efectos de aumentar las perspectivas de aislamiento. Para ello se emplean los medios de cultivo sólidos distribuidos en placas, con los cuales se obtienen los denominados cultivos primarios. Estos cultivos permiten examinar macro y microscópicamente las diferentes características de las colonias bacterianas aisladas. Una correcta interpretación de estas características, posibilita realizar una identificación preliminar y facilita la posterior selección de los medios de cultivo y pruebas diferenciales complementarias para la identificación de los aislamientos.

TÉCNICA DE INOCULACIÓN O SIEMBRA EN PLACA

Aquellas muestras que tengan un contenido microbiano muy grande, deberán diluirse previamente en caldo o solución fisiológica.

El inóculo a sembrar debe ser una mezcla lo más homogénea posible. Se deposita este inóculo sobre la placa con medio de cultivo, mediante un ansa esterilizada a la llama de un mechero

Bunsen, o con un hisopo (solamente para depositar la muestra) u otro dispositivo previamente esterilizado.

(Fig.1) A partir del inóculo se realizan estrías sucesivas con el ansa estéril en un cuadrante de la superficie del medio de cultivo, realizando de borde a borde un movimiento en zigzag hacia abajo (1). Luego esterilizar el ansa, girar la placa en ángulo de 90° y repetir el movimiento anterior (2). Proceder de igual manera con los otros cuadrantes, tocando en cada caso las dos últimas estrías del trazado anterior y teniendo la precaución de esterilizar el ansa en las sucesivas estrías (3 y 4).

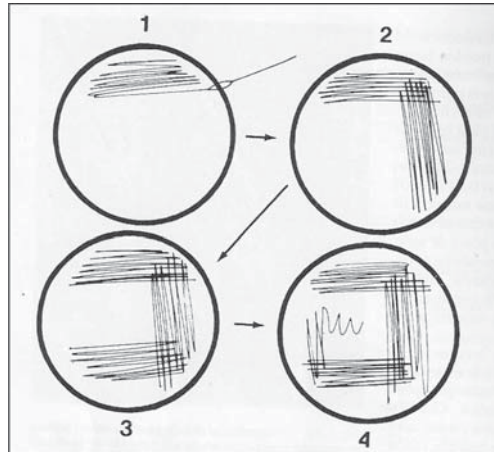
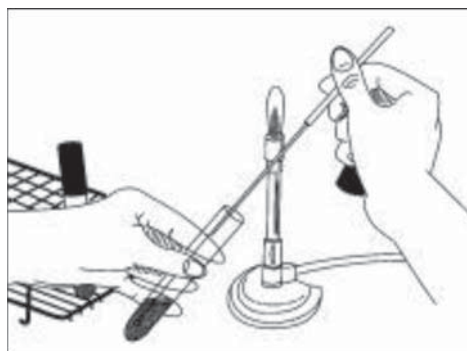


Fig.1: Inoculación de placas de cultivo para el aislamiento de colonias bacterianas.

El propósito de esta técnica es diluir el inóculo lo suficiente sobre la superficie del agar para poder obtener colonias bacterianas aisladas. Las colonias aisladas se pueden subcultivar individualmente transfiriéndolas a otra placa o medio a fin de obtener cultivos puros para su posterior estudio.

El cultivo o siembra de microorganismos, y en general todo trabajo en microbiología, requiere de rigurosas condiciones de asepsia y desinfección del lugar de trabajo, un ambiente donde no haya corrientes de aire ni turbulencia de la atmósfera por movimiento de personas; además del empleo de adecuados procedimientos de limpieza, acondicionamiento y esterilización del material a utilizar, y de una correcta preparación y esterilización de los medios de cultivo a usar.

Todas las siembras se efectuarán frente a la llama de un mechero de Bunsen y a una distancia no mayor a 15 cm.



De esta manera los microorganismos del aire son arrastrados hacia arriba por las corrientes de convección causadas por la llama y tienden a no caer en la superficie del medio.

INCUBACIÓN:

La incubación requiere temperatura, medio ambiente y tiempo determinados.

Los medios de cultivo sembrados se incuban en estufas de cultivo, por lo general a 37°C, otras especies microbianas requieren temperaturas diferentes para su crecimiento óptimo.

Los microorganismos incubados crecen bajo distintas condiciones ambientales, algunos lo hacen en aerobiosis, otras crecen mejor con un 2-10% de aumento de CO₂.

Un procedimiento sencillo para crear una atmósfera aumentada en dióxido carbónico y reducir el oxígeno presente, consiste en colocar los cultivos sembrados en un recipiente con una vela, la que se enciende y luego se cierra el recipiente.

El tiempo de incubación es de 18 a 24 hs. por lo general, existen microorganismos que requieren más tiempo.

INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS:

Transcurrido el tiempo de incubación, se evalúa el desarrollo en base a:

- Examen macroscópico: observación de las características y cantidad relativa de cada tipo de colonia aislada.
- Examen microscópico: mediante coloraciones en frotis de las colonias sospechosas.
- Observación de posibles cambios en el medio que rodea a las colonias aisladas.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS (ver libros bibliografía):

Consiste en el examen visual o con lupa del desarrollo en la superficie de los medios en placa o tubo. Las placas se observan en diferentes direcciones y con buena luz. El empleo de una lupa es útil para la detección de colonias minúsculas. Las placas de agar sangre se deben examinar a trasluz, empleando iluminación brillante a fin de detectar reacciones hemolíticas en el agar.

Las características generales de las colonias que pueden ser utilizadas en la identificación de las bacterias son:

Tamaño: diámetro en mm.

Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.

Elevación: plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme, umbilicada.

Color: blanco, amarillo, naranja, negro, etc.

Superficie: brillante, mate, etc.

Densidad: opaca, translúcida, transparente, etc.-

Margen (borde de la colonia): entero, ondulado, lobulado, aserrado, filamentoso, rizado, etc.

Consistencia: butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza, dura, etc.

Las reacciones observadas en medios de agar que son útiles para la identificación de bacterias son:

HEMÓLISIS EN AGAR SANGRE

- colonias β -hemolíticas: hemólisis total (zona de aclaramiento completo de la sangre alrededor de las colonias debido a la lisis de los glóbulos rojos).

- colonias α -hemolíticas: hemólisis parcial (aclaramiento parcial de la sangre alrededor de las colonias con coloración verde del medio).

- colonias γ -no hemolíticas. (No cambia el medio que rodea a las colonias; no hay lisis de glóbulos rojos).

PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS EN MEDIOS DE AGAR

- Pigmentos hidrosolubles que colorean el medio: piocianina, fluoresceína.
- Pigmentos no difusibles confinados a las colonias.

OLOR

Los olores producidos por acción metabólica de ciertas bacterias (en medios sólidos o líquidos), si bien son difíciles de describir específicamente, pueden ser útiles para la identificación tentativa (ej.: *Pseudomonas* spp, olor a frutas; *Proteus* spp, chocolate quemado; *Clostridium*, fétido).

Cambios en medios diferenciales

Los distintos colorantes, indicadores de PH y otros componentes que se incluyen en los medios diferenciales y actúan como indicadores de las actividades enzimáticas ayudan a identificar las bacterias.

La observación inicial de las colonias obtenidas en un cultivo primario, más el estudio microscópico de las mismas, orientan al microbiólogo en la identificación preliminar y son útiles en la selección de otros medios y pruebas diferenciales para completar la identificación de las bacterias aisladas.

TÉCNICAS DE INOCULACIÓN EN TUBOS

Se realizan en medios de cultivos sólidos con agar al 1,5% en pico de flauta, semisólidos con agar al 0,3-0,5% o medios líquidos como caldos de enriquecimiento y medios especiales para pruebas diferenciales.

Son empleados para subcultivar las colonias bacterianas aisladas en cultivos primarios, también para los subcultivos y diferentes pruebas diferenciales en medios sólidos especiales para su identificación.

En general, se utiliza el ansa ojal para la siembra en estría y el ansa aguja para la siembra por punción en profundidad.

- **Medios de cultivo sólidos (en pico de flauta):** Subcultivos: procedimiento para la transferencia de cultivos puros.

- a)- se examina la placa sembrada para aislamiento y se escoge la colonia que se va a transferir.
- b)- se toma con el ansa, previamente esterilizada a la llama y enfriada, una porción de la colonia y se introduce al fondo de un tubo que contiene el medio de cultivo en "pico de flauta", y a partir de allí se siembra por estrías en la superficie inclinada del medio, con un movimiento ascendente en "S" hacia la boca del tubo como lo indica la Fig. 2.
- c)- para medios inclinados especiales (Kliger, TSI), se atraviesa la columna de agar hasta aproximadamente la mitad de su altura con un movimiento perpendicular a la superficie, utilizando el ansa aguja. Luego se prosigue la siembra por estrías como lo indica la Fig.3.

Incubación: 18 a 24 hs. a 35-37°C, en la mayoría de los casos. Tener en cuenta que hay gérmenes que requieren otras temperaturas óptimas y otros tiempos.

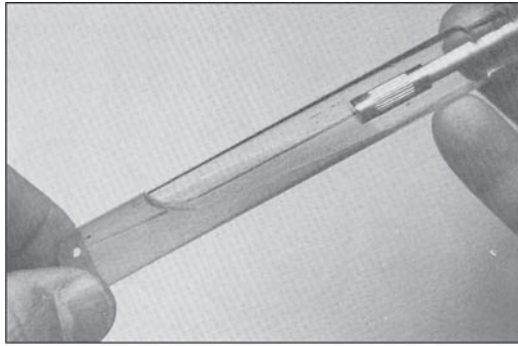


Fig. 2

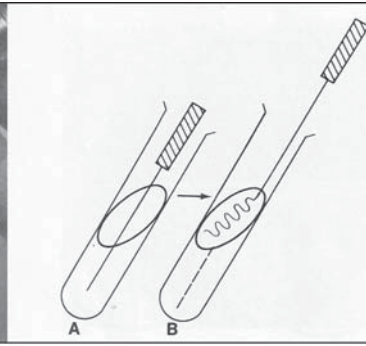
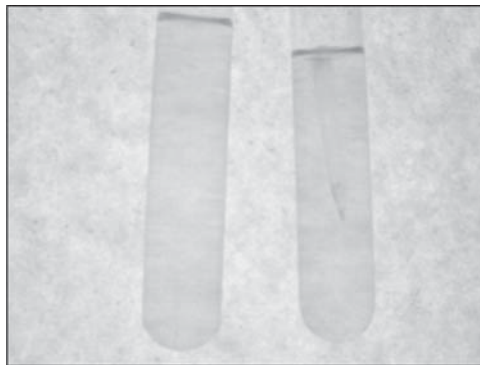


Fig. 3

- Siembra en tubos con agar semisólido

Se realiza para pruebas de movilidad, empleando el ansa aguja. Se carga la misma con la colonia sospechosa y se siembra introduciéndola en la columna de agar en forma perpendicular a la superficie y se retira siguiendo el mismo trayecto utilizado para sembrar.

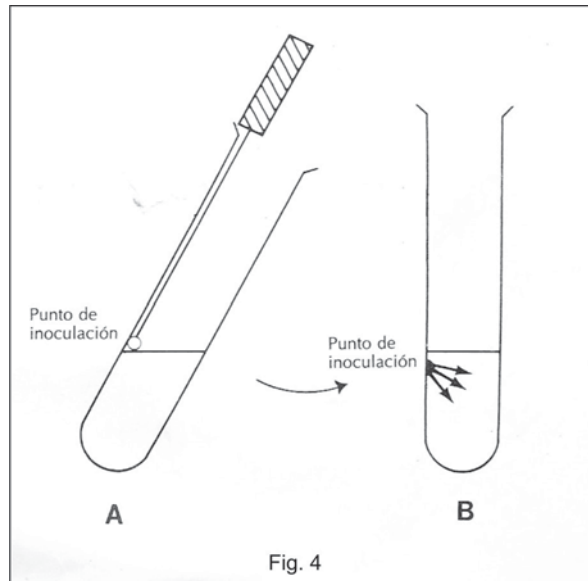
De este modo, se observa fácilmente el crecimiento de organismos móviles que difunden de la línea de siembra. Los organismos inmóviles, muestran crecimiento solamente en la línea de siembra, mientras que el medio circundante permanece claro.



Siembra en tubos con medios líquidos

Los caldos de cultivo son muy útiles cuando en una muestra se encuentran pocas bacterias. Los caldos de enriquecimiento promueven el crecimiento bacteriano, sobre todo de patógenos que generalmente se encuentran en número reducido.

Para la siembra en estos medios puede tomarse un inóculo grande de la muestra en estudio, e incubarse por períodos variables de tiempo. Otros medios líquidos, son utilizados para pruebas bioquímicas diferenciales, en estos casos se siembran a partir de colonias aisladas en cultivos puros. Para ello se emulsionan las colonias en las paredes internas del tubo y próximos a la superficie del medio y se agita suavemente, repitiéndose el procedimiento en caso necesario.



3- TÉCNICAS DE RECuento:

La enumeración o recuento bacteriano se realiza por métodos directos e indirectos, aunque ninguno de ellos es exacto, el recuento es de valor y suficientemente preciso cuando se fijan límites y parámetros, como por ejemplo temperatura, tiempo, pH, atmósfera, etc.

Su uso está muy desarrollado en el recuento bacteriano de alimentos en general, leche, agua, y muestras para diagnósticos de enfermedades infecciosas en el hombre y en el animal, por ejemplo orina.

En este trabajo práctico sólo veremos dos métodos:

TÉCNICA POR DILUCIÓN EN CAJAS DE PETRI:

- Una cantidad medida de la muestra o una dilución de la misma se mezcla en una caja de Petri esterilizada con 15 ml de agar fundido y enfriado a 50°C. Se incuba a 37°C por 18-24 horas y posteriormente se hace el recuento de colonias a simple vista, en un contador especial, o empleando una lupa.

- Para la preparación de las diluciones se utiliza buffer, solución fisiológica o medio de cultivo esterilizado, dependiendo del tipo de muestra en estudio.

- El procedimiento es el siguiente:

- 1- Homogeneizar la muestra.

- 2- Preparar diluciones de la muestra mezclando con el diluyente apropiado en tubos estériles:

- 1:100 (10^{-2}) = 0,1 ml de muestra + 9,9 ml de Sol. fisiológica.

- 1:1000 (10^{-3}) = 1 ml de la dilución 10^{-2} + 9 ml de Sol. fisiológica.

- 1:10000 (10^{-4}) = 1 ml de la dilución 10^{-3} + 9 ml de Sol. fisiológica.

Utilizar para cada dilución pipetas estériles y agitar bien antes de cada transferencia (ver fig. 5).

- 3- Pasar 1 ml de cada una de las diluciones a cajas de Petri estériles previamente rotuladas.

- 4- Agregar 15 ml de agar fundido y enfriado a 50°C. Homogeneizar cuidadosamente.

- 5- Incubación. Una vez solidificado el medio se invierten las placas y se llevan a incubar a 37°C 18 hs o más.

6- Lectura: efectuar el recuento de las colonias en lo posible en aquellas placas que presentan 30 a 300 colonias y multiplicar por el factor de dilución. El recuento se expresa como N° de colonias/ml de la muestra original.

TÉCNICA POR ESTRÍAS EN MEDIOS DE AGAR:

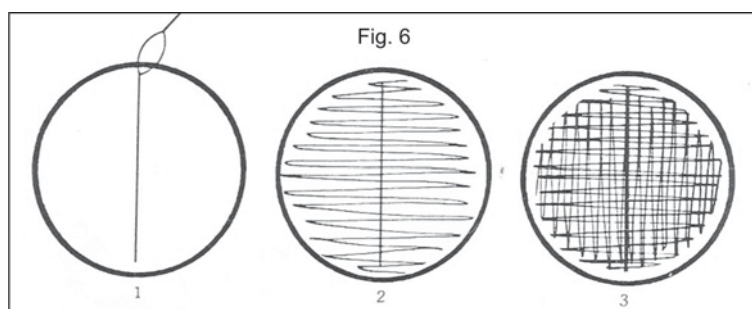
1- Se sumerge en la muestra un ansa calibrada (0,02; 0,01; 0,001 ml de muestra) ejemplo: orina no centrifugada y previamente homogeneizada. Es suficiente con introducir el aro del ansa en el líquido para que la misma quede cargada, teniendo en cuenta que al sacarla sea en forma vertical.

2- En una placa de agar (C.L.D.E. para orina) se practica una sola estría con el ansa cargada sobre la superficie del agar, a lo largo del diámetro de la placa.

3- Este inóculo se disemina uniformemente en ángulo recto respecto de la estría primaria, para lo cual se gira la placa en ángulo de 90° y se vuelve a diseminar el inóculo hasta cubrir toda la superficie del agar. Se repite la operación si es necesario en distintos ángulos de giro (fig. 6).

4- **Incubación:** 35-37°C 18-24 hs.

5- **Lectura:** Se efectúa la 1ª lectura a las 24 hs., si no hay desarrollo se incuba 24 hs. más; caso contrario se cuenta el N° de colonias que aparecen en la superficie de los medios y se multiplica por el factor de dilución. El recuento se expresa, como N° de colonias por ml de la muestra original.



PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

1- A partir de una muestra clínica se realizarán cultivos primarios (siembra por estrías en medios en placas).

2- Siembra de la muestra en un caldo de enriquecimiento.

3- Observación de las características macroscópicas y siembra de las colonias aisladas, en medios de agar inclinados para la obtención de cultivos puros.

4- Observación microscópica por coloración de Gram de la muestra en estudio y de los aislamientos.

BIBLIOGRAFÍA

LENNETE, E.H. Microbiología Clínica. Ed. Med. Panamericana
KONEMAN, E.W. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Med. Panamericana.
BAILEY-SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Med. Panamericana.
IOVINE-SELVA. El Laboratorio en la Clínica. Ed. Med. Panamericana.
GARDNER-PROVINE. Manual de infecciones bacterianas agudas. Ed. Med. Panamericana.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 7

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS BACILOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS O FACULTATIVOS.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La identificación bacteriana se inicia 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 de 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 de cultivos que contienen sustratos específicos e indicadores químicos que detectan cambios de pH o la presencia de subproductos específicos.

La clave para identificar las bacterias depende del aislamiento en cultivo puro. Las pruebas de identificación se deben hacer siempre con colonias únicas o cultivos puros.

El microbiólogo debe seleccionar el conjunto apropiado de características requeridas para la identificación de cada grupo de bacterias.

Entre los bacilos Gram negativos existen varias familias y géneros de interés médico. Entre ellas podemos nombrar a la familia *Enterobacteriaceae*, los bacilos no fermentadores (BNF), *Vibrio* y *Aeromonas*.

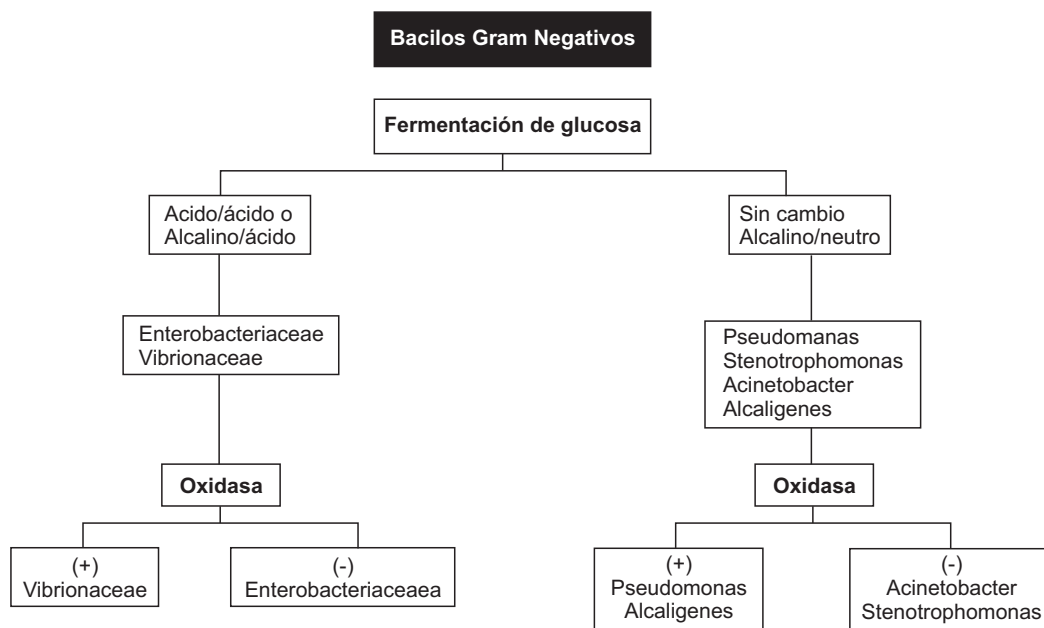
Enterobacterias

Son bacilos Gram negativos que no forman esporas, se caracterizan por crecer con facilidad en medios ordinarios, tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

Utilizan la glucosa en forma fermentativa, con formación de ácidos y gases, reducen los nitratos a nitritos y dan una reacción negativa frente a la oxidasa. Ejemplos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella*, *Shigella* etc

Bacilos gram negativos no fermentadores

El término “no fermentadores” está referido a un grupo de bacilos Gram negativos aerobios, no esporulados, que son incapaces de utilizar hidratos de carbono como fuente de energía, o que los degradan por la “vía oxidativa” más bien que por la “vía fermentativa”. Los más frecuentemente aislados son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.



DETECCION DE FERMENTADORES DE GLUCOSA Y LACTOSA EN AGAR HIERRO DE KLIGER O EN AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI)

Estas pruebas se usan para orientar en la identificación inicial de los bacilos Gram (-), en especial de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

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:

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

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

El medio **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.

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, amarillo (pH menor a 6,8) y rojo (pH 7,4).

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.

co, es aerobia; la porción, llamada fondo o profundidad, está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al preparar los medios es importante que el pico y el fondo tengan aproximadamente 3 cm de longitud cada uno, a fin de conservar este efecto de las dos cámaras.

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

INTERPRETACIÓN:

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:

1)- Alcalina/Ácida: solamente es fermentada la glucosa.

2)- Ácida/Ácida: son fermentadas la glucosa y la lactosa (y/o sacarosa en el **TSI**)

3)- Alcalina/Alcalina: no es fermentada la glucosa ni la lactosa (y/o sacarosa en el **TSI**). Utilizan peptonas.

4)- Alcalina/ Sin cambio: no son fermentadas glucosa ni lactosa (y/o sacarosa en el **TSI**). Utilizan peptonas.

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

1.1. Fermentación de glucosa solamente:

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

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

Precauciones:

Es fundamental leer e interpretar un tubo de **AHK** o **TSI** dentro del período de incubación de 18 a 24 hs. Si se lee antes, por ejemplo a las 12 hs, puede obtenerse un resultado 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. Por otra parte, un tubo de **AHK** leído después de 24 hs 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.

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

1.2. Fermentación de lactosa y glucosa:

Esta reacción (ácida/ácida) se da en los microorganismos que fermentan tanto la lactosa como la glucosa en busca de elementos nutritivos, dando después de 18 a 24 hs de incubación una

reacción ácida (amarilla) en el pico de flauta y también en zona profunda del tubo. La concentración de lactosa del 1 % (diez veces mas que la glucosa) en un período de incubación de 18 a 24 hs, aún no se ha consumido y existe una condición ácida. Si se lee el mismo tubo después de 48 hs, el pico de flauta se vuelve alcalino por depleción de la lactosa y la utilización de las peptonas. Ejemplo de bacterias que fermenten glucosa y lactosa (y/o sacarosa en el TSI), coliformes como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*.

1.3. 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 aminos 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 *Pseudomonas aeruginosa*.

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

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

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

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

2- PRUEBA DE OXIDACION-FERMENTACION (OF)

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

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

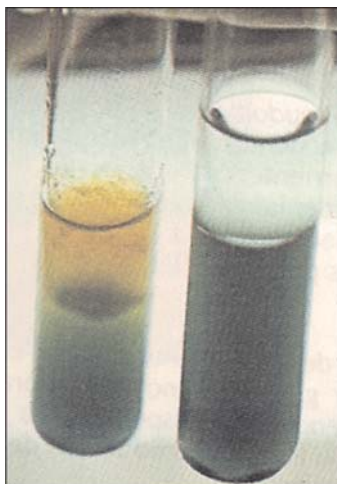
Este medio tiene una concentración aumentada de glucosa y un indicador de pH.

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

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

Interpretación:

Tubo abierto	Tubo cubierto	Tipo de metabolismo
Acida (amarilla)	Alcalina (verde)	Oxidativo
Acida (amarilla)	Acida (amarilla)	Fermentativo
Alcalina (verde)	Alcalina (verde)	No sacarolíticos o inactivo



3- FERMENTACION DE HIDRATOS DE CARBONO

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

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

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

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

4- PRUEBA DE LA OXIDASA

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

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

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

1) La técnica directa en placa, en la cual se añaden directamente 2 o 3 gotas del reactivo a las colonias bacterianas aisladas que se desarrollan en placas.

2) 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 una ansa de la colonia sospechosa.

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



Interpretación:

Oxidasa (+) = color púrpura Oxidasa (-) = incolora.

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

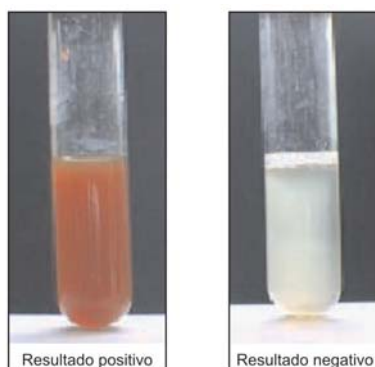
5- PRUEBA DE REDUCCION DEL NITRATO

Determina la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitrito por acción de la enzima nitrato reductasa respiratoria.

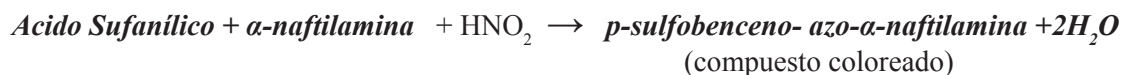
PROCEDIMIENTO:

Se siembra el microorganismo en un medio con peptona, extracto de carne, nitrato de potasio y agua destilada (Caldo nitrato o agar nitrato en pico). Se incuba a 35° C durante 18 a 24 hs. Finalizada la incubación se agregan el reactivo A (alfa naftil amina en ácido acético) y el reactivo B (ácido sulfanílico en ácido acético). El desarrollo de color rojo dentro de los 30 segundos (por formación de un compuesto coloreado de diazotación con el nitrito) representa una reacción positiva para la reducción de nitratos.

La ausencia de color tras el agregado de los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico (NO) u óxido nitroso, e hidroxilamina. Dado que los reactivos detectan solo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un color rojo tras agregar polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirman la reacción negativa verdadera.



Reacción de la fase 1°:



Reacción de la fase 2°: método de reducción del zinc.



6- 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:

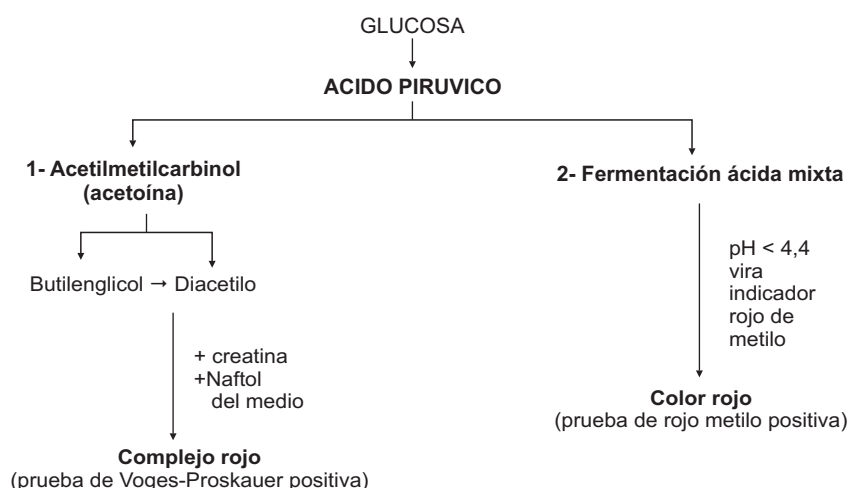
- 1)- Butilenglicol.
- 2)- La fermentación ácida mixta.

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.

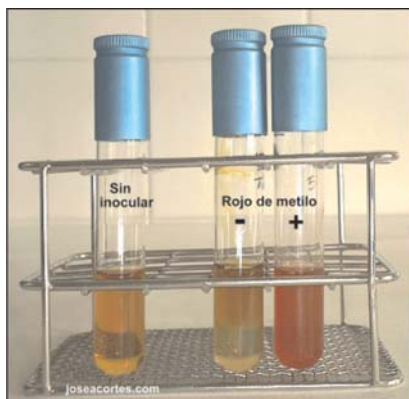


PROCEDIMIENTO:

Se siembra el caldo RM/VP con un cultivo puro del microorganismo en estudio, se incuba a 35° C durante 48 hs (no menos) y hasta 5 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 2 a 5 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.



7.- PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER

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

PROCEDIMIENTO:

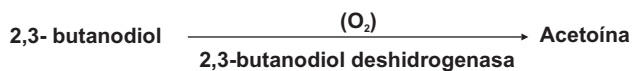
Se siembra el caldo RM/VP con un cultivo puro del microorganismo en estudio, se incuba a 35° C durante 48 hs. Finalizado este período se divide en 2 fracciones: una de ellas (A) para la prueba de RM y la otra (B) para el VP.

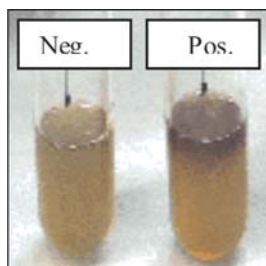
A la alícuota (B) del caldo RM/VP se agregan los siguientes reactivos respetando el orden:

a) 0,6 ml. de alfa-naftol al 5%.

b) 0,2 ml. de KOH al 40%.

c) 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.

5. PRUEBA 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_3OH) alcalinizando el medio.

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

8.1. MEDIO CITRATADO DE KOSER:

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

8.2. MEDIO CITRATADO DE SIMMONS:

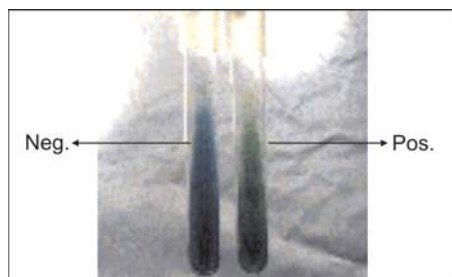
Al caldo de Koser se le agrega agar y azul de bromotimol, con lo cual el punto final es un cambio de color visible en el medio.

PROCEDIMIENTO:

Se vierte el medio citratado de Simmons en un tubo y se deja solidificar en pico de flauta. Se estría la superficie del pico con un inóculo escaso 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.

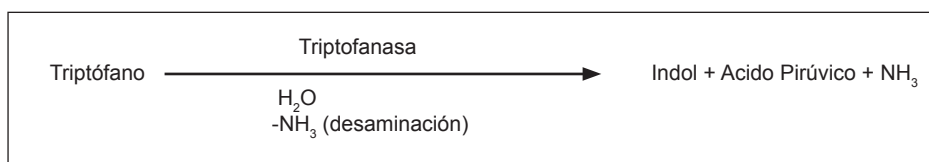
Luego de incubar a 35°C durante 24 a 48 hs (hasta 4 días), el desarrollo bacteriano y el color azul intenso indican que la prueba es positiva y revela que el microorganismo ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con la formación de productos alcalinos.

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



6. INDOL

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



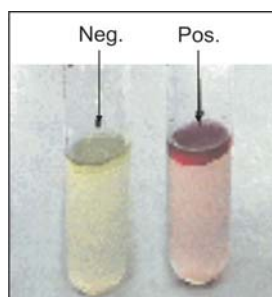
PROCEDIMIENTO:

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

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

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

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



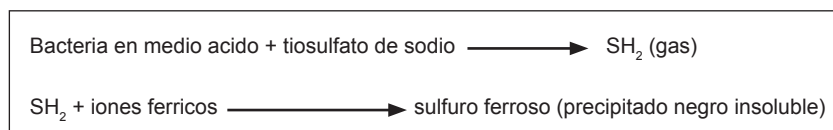
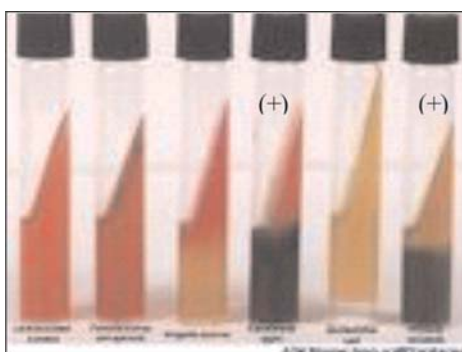
7. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHIDRICO

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 (sulfuro del metal pesado) indicando la positividad de la reacción.

El indicador mas sensible es el acetato de plomo, que, como suele inhibir el desarrollo de muchas bacterias, se lo utiliza impregnado en una tira de papel de filtro que se fija al tapón del tubo de cultivo, y no se incorpora al medio. El punto final lo da el ennegrecimiento de la tira que se detecta a las 24 a 48 hs. Puede detectarse el sulfhídrico en medios de cultivo como el SIM, TSI, KIA. 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 esta dado por un precipitado negro insoluble de sulfuro del metal pesado formado en el medio.



8. PRUEBA DE LA MOTILIDAD

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

PROCEDIMIENTO:

Se usan medios semisólidos para detectar la movilidad. Se emplea el medio SIM que determina otras características además de la movilidad.

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

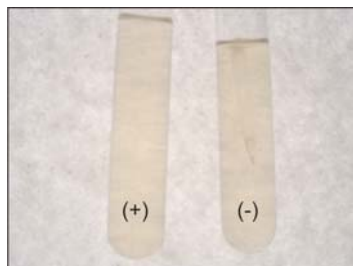
Interpretación:

Prueba positiva:

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

Prueba negativa:

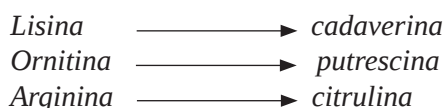
Crecimiento bacteriano únicamente en la línea de siembra.



9. DESCARBOXILASAS

Muchas especies de bacterias poseen enzimas llamadas descarboxilasas, capaces de actuar sobre el grupo carboxilo de los aminoácidos, con formación de aminas de reacción alcalina. Esta reacción, conocida como descarboxilación, produce dióxido de carbono como producto secundario.

Cada una de las descarboxilasas es específica para un aminoácido. Lisina, ornitina y arginina son los tres aminoácidos ensayados habitualmente en la identificación de las enterobacterias y producen las siguientes aminas específicas:



En la conversión de arginina a citrulina interviene una dehidrolasa más bien que una descarboxilasa ya que en primer término un grupo amino es eliminado de la arginina. La citrulina es transformada en ornitina, que luego sufre descarboxilación para formar putrescina.

El medio base más comúnmente usado es el caldo descarboxilasa de Moeller, que contiene peptona, extracto de carne, pequeña cantidad de glucosa, púrpura de bromocresol como indicador, Piridoxal que actúa como coenzima, acentuando la actividad de la descarboxilasa. El pH del medio está estabilizado en 6,0, más ácido que la mayoría de los medios de cultivo porque las descarboxilasas recién son óptimamente activas cuando el pH del medio cae por debajo de 5,5. Este descenso del pH de 6,0 a 5,5 se logra por las bacterias en desarrollo que utilizan una pequeña cantidad de glucosa del medio con la producción de ácidos mixtos. Se agrega al medio el aminoácido : lisina, ornitina o arginina (sólo uno de ellos), en una concentración final del 1 %.

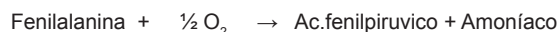
PROCEDIMIENTO:

Se siembra una colonia del microorganismo en estudio en dos tubos con caldo descarboxilasa de Moeller, uno con el aminoácido a ensayar y el otro sin el aminoácido (control). Se cubren ambos tubos con una capa de aceite mineral estéril de 1 cm de espesor y se incuban a 35° C durante 18 a 24 hs.

El desarrollo de un color amarillo en el tubo control indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido lo suficiente como para activar las descarboxilasas. El retorno al color azul púrpura del tubo que contiene el aminoácido, indica una reacción positiva.

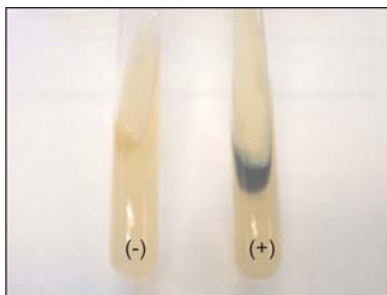
10. PRUEBA DE LA FENILALANINA DESAMINASA

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 hs. Se agrega directamente 4 o 5 gotas de reactivo (tricloruro de hierro) al 10 % directamente sobre la superficie del agar. Si la reacción es positiva, se observa inmediatamente la aparición de un color verde intenso en el pico de flauta y en el líquido de sinéresis. Algunas especies desaminan la fenilalanina tan rápidamente que la prueba puede ser positiva ya a las 4 hs de incubación. La coloración se desvanece en unos 10 minutos, en consecuencia la observación debe realizarse inmediatamente después de agregar el reactivo.



11. REACCION DE LA UREASA

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



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

PROCEDIMIENTO:

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

Incubar ambos medios a 35° C durante 18 a 24 hs. Una reacción positiva se pone de manifiesto por el cambio de color (rojo). 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.



12. PRUEBA DEL ONPG PARA LA DETECCIÓN DE B-GALACTOSIDASA

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

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

Se carga un ansa con bacterias desarrolladas y se emulsiona en 0,5 ml de solución fisiológica hasta producir una suspensión abundante, añadir a la suspensión un disco de ONPG. Incubar a 37° C. por 20 minutos . Si es negativo dejar 24 hs. más.



INTERPRETACIÓN:

ONPG (+) = color amarillo

ONPG (-) = incoloro

BIBLIOGRAFÍA

Diagnóstico Microbiológico. Bailey y Scott. Editorial Panamericana. 1991

Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia clínica. Mac Faddin Editorial Panamericana. 1980.

Diagnóstico Microbiológico. Koneman. Editorial Panamericana. 1983

Tratado de Microbiología. Davis Dulbeco y Col. Editorial Salvat.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

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

MATERIALES:

- 1)- Picos de Agar Nutritivo con cultivos de Bacilos Gram negativos.
- 2)- Medios de cultivo preparados y fraccionados para las pruebas bioquímicas, los cuales serán sembrados con el microorganismo incógnita.
Se emplearán los siguientes:
 - Agar citrato de Simons
 - Agar fenilalanina
 - Agar urea
 - BAM
 - SIM
 - TSI
 - Caldos descarboxilasas
 - Medio de Clark y Lubs.
- 3)- Reactivos para la lectura de las reacciones bioquímicas.
- 4)- Estufas de 37° C.
- 5)- Ansa aguja y ansa ojal.

MÉTODO:

Primer día:

Siembra de los medios de cultivo para pruebas bioquímicas.

En cada uno de los medios indicados se procederá a inocular la cepa correspondiente en la forma que indicará el docente.

Todos los cultivos se llevarán a incubar a 37° C por 24-48 hs.

Segundo día:

Se procederá a la lectura de los resultados de las pruebas bioquímicas agregando los reactivos que las pruebas requieran y se registrarán los resultados en el cuadro siguiente:

PRUEBAS BIOQUIMICAS	LECTURAS 24 Hs.	LECTURAS 48 Hs.
Oxidasa		
TSI		
Sulfhídrico Reducción		
Indol		
Movilidad		
Citrato		
Rojo de Metilo		
Voges Prokauer		
Fenilalanina desaminasa		
Ureasa		
		IDENTIFICACION DEL GERMEN:

Pruebas mínimas de identificación de enterobacterias más frecuentes en clínica

Género	TSI	Gas	SH ₂	RM	VP	I	Cit	FA	Urea	Mov	Lis	Arg	Orn
<i>Escherichia</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	v	v
<i>Shigella</i>	K/A	-	-	+	-	v	-	-	-	-	-	-	+
<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>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	-*	-	-	+

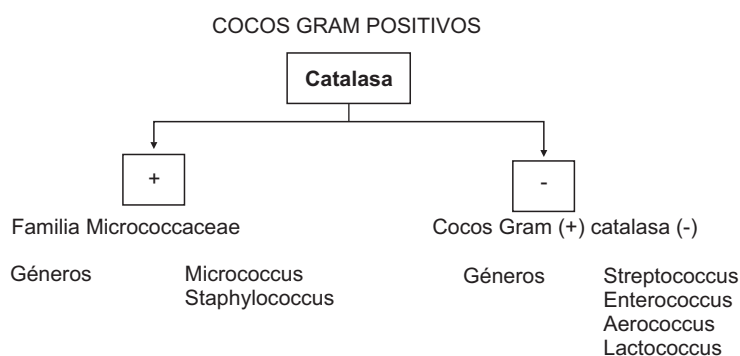
TSI: Agar Hierro Triple Azúcar, RM: Rojo de Metilo, VP: Voges-Proskauer, I: Indol, Cit: Citrato, FA: Fenilalanina, Mov: Movilidad, Lis: Lisina, Arg: Arginina, Orn: Ornitina, A: Acido, K: Alcalina, ++: 90% o más positivas, -: 90% o más negativas, v: variable. Las zonas sombreadas indican las reacciones claves. * No móviles a 35°-37°C, móviles a 22°C. (Esquema adaptado de Koneman, Stephen, Allen, Janda, Schreckenber, Winn. *Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Ed. Lippincott. 1997).

TRABAJO PRÁCTICO Nº 8

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS COCOS GRAM POSITIVOS

Existen tres géneros de cocos Gram positivos de gran interés en patología médica: *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. En la tinción de Gram, su morfología presenta algunos caracteres diferenciales; ya que los estafilococos se agrupan en racimos y los estreptococos y enterococos en cadenas o en parejas.

Los tres géneros son aerobios y anaerobios facultativos; los estafilococos y los enterococos crecen en medios usuales, en tanto que los estreptococos requieren agar sangre.



1.-PRUEBA DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en oxígeno y agua. Excluyendo a los estreptococos, la mayoría de las bacterias anaerobias facultativas y aerobias poseen actividad de catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias descompone el peróxido de hidrógeno con peroxidasa semejantes a la catalasa.

Esta prueba, llevada a cabo en portaobjetos o en tubos, es comúnmente utilizada para diferenciar estafilococos (positivo) de estreptococos (negativo) o de especies de bacilos Gram (+) y micobacterias.

a) Prueba en portaobjeto:

- 1) Con un ansa aguja transferir células 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.

b) Método en tubos o placas de agar:

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

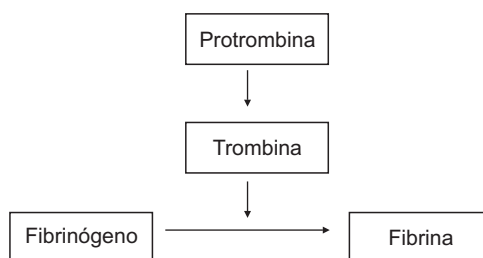
Interpretación:

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

2- PRUEBA DE LA COAGULASA

El *Staphylococcus aureus* es identificado por medio de la presencia de la enzima coagulasa.

La coagulasa libre es una sustancia semejante a la protrombina que reacciona con los factores plasmáticos normales para formar una sustancia semejante a la trombina, que a su vez, activa el fibrinógeno para formar fibrina.



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:

1) Coagulasa fija (prueba en portaobjetos): Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos.

2) Coagulasa libre (prueba en tubos): Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

PROCEDIMIENTO:**La prueba en portaobjeto (coagulasa fija).**

Se toman 2 ó 3 colonias del medio de cultivo, se realiza una suspensión espesa en una gota de plasma depositada en un porta.

En caso positivo, se observa la inmediata formación de un precipitado macroscópico en forma de aglutinados blancos. Se debe realizar en todos los casos un control con una cepa positiva conocida. La prueba es negativa si se observa aglutinado en el control y no hay aglutinación en el problema. La prueba de la coagulasa en portaobjeto es un método presuntivo y todos los resultados negativos o retardados deben ser confirmados con la prueba en tubo.

La prueba en tubo (coagulasa libre y coagulasa fija)

Se lleva a cabo sembrando en 0,5 ml de plasma humano o de conejo con un ansa que contenga abundante material de colonia sospechosa y se coloca en baño de agua a 37° C o estufa a 37°C Igual procedimiento se realiza con la cepa de *Staphylococcus aureus* (control positivo). Si al cabo de 4 hs no hay coágulo visible se deja 24 hs. La lectura se realiza inclinando suavemente los tubos. Las cepas coagulasa (-) no producen coágulo. Este método detecta tanto la coagulasa libre como la fija.

3- PRUEBA DEL MANITOL

El agar manitol salado es un medio altamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos en cultivos mixtos. Este medio aprovecha la capacidad de los estafilococos de desarrollar en presencia de cloruro de sodio al 7,5% y la del *Staphylococcus aureus* de fermentar manitol con producción de ácido. Posee rojo fenol como indicador de pH.

TÉCNICA:

Se distribuye el agar manitol en forma de pico de flauta, se siembra la colonia sospechosa en zigzag, se incuba 28-24 hs a 37 °C.

INTERPRETACIÓN:

Prueba positiva: viraje del medio (color rojo) al amarillo, con abundante crecimiento.

Prueba negativa: no cambia el color, hay un desarrollo pobre de las colonias.

4- PRUEBA DE LA FOSFATASA

La prueba de la fosfatasa se utiliza sobre todo para las cepas patógenas de estafilococos. Determina la capacidad del microorganismo de producir la enzima fosfatasa; la que se pone en evidencia al desdoblar el difosfato de fenolftaleína:



PROCEDIMIENTO:

De un cultivo de 18 a 24 hs, se extrae la colonia sospechosa y se siembra por estrías en una placa de Petri conteniendo Agar Nutritivo con difosfato de fenolftaleína; luego se incuba a 37° C por 18 a 24 hs. Luego se expone la placa a los vapores y se hace la lectura e interpretación.

Prueba positiva: colonias color rojo rosado brillante

Prueba negativa: no se produce cambio de color.

5.-PRUEBA DNASA

Se evidencia la capacidad de producir la enzima desoxirribonucleasa. Se pone de manifiesto detectando la destrucción del DNA.

TÉCNICA:

Inocular una placa de agar con DNA al 0,2%, con una estría de por lo menos 2 cm con la cepa incógnita y con un patrón positivo. Incubar 18-24 hs. Inundar la placa con HCL 1N.

INTERPRETACIÓN:

Prueba positiva: una zona clara alrededor del cultivo (se ha destruido el DNA).

Prueba negativa: no se advierte zona clara (las sales de DNA son precipitadas por el HCL).

6.- PRUEBA DE LA SUCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA

Se utiliza un disco de Novobiocina, se coloca directamente sobre la superficie de agar Mueller Hinton sembrada con bacterias. El antibiótico comienza a difundir e inhibe el desarrollo de las bacterias formándose un halo de inhibición del desarrollo.

TÉCNICA:

- 1)- Realizar una suspensión bacteriana con solución fisiológica y comparar la turbidez con la escala de Mac Farland sembrar con un hisopo en tres direcciones, tratando de cubrir por lo menos un área de 3 cm de diámetro.
- 2)- Colocar un disco de novobiocina en el centro del área sembrada. Presionar suavemente el disco con una pinza estéril, de modo que se adhiera a la superficie del agar.
- 3)- Invertir la placa e incubarla a 35° C durante 18 a 24 hs.

INTERPRETACIÓN:

	SENSIBLE	RESISTENTE
NOVOBIOCINA	mayor a 16 mm	menor a 15 mm

7- PRUEBA DE LA SUCEPTIBILIDAD A LA OPTOQUINA Y BACITRACINA

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

TÉCNICA:

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

INTERPRETACIÓN:

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

	SENSIBLE	RESISTENTE
BACITRACINA	Mayor a 10 mm	Menor a 9 mm
OPTOQUINA	Mayor a 14 mm	Menor a 13 mm

8- PRUEBA DE BILIS -ESCULINA

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

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

INTERPRETACIÓN:

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

9- PRUEBA CAMP

La actividad hemolítica de la β lisina estafilocócica sobre los eritrocitos se ve intensificada por un factor extracelular producido por estreptococos del grupo B, llamado factor CAMP. Por lo tanto, toda vez que dos reactantes se superponen en una placa de agar sangre ovina se advierte una intensificación de la reacción β hemolítica.

TÉCNICA:

La prueba CAMP se realiza trazando una estría de estreptococos (por identificar) en forma perpendicular a otra estría de una cepa de *Staphylococcus aureus* conocida como productora de β lisina. Ambas líneas no deben tocarse. Las placas inoculadas se deben incubar en atmósfera ambiente.

INTERPRETACIÓN:

La zona de intensificación de lisis asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Diagnóstico Microbiológico. Bailey y Scott. Editorial Panamericana. 1991.
Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia clínica. Mac Faddin Editorial Panamericana. 1980.
Diagnóstico Microbiológico. Koneman. Editorial Panamericana. 1983.
Tratado de Microbiología. Davis Dulbeco y Col. Editorial Salvat.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

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

Materiales:

- 1)- Picos de Agar Nutritivo y Picos de Agar sangre con cepas de Cocos Gram positivos.
- 2)- Medios de cultivo preparados y fraccionados para las pruebas bioquímicas, los cuales serán sembrados con el microorganismo incógnita.

Se emplearán los siguientes:

- Agar BÍlis Esculina
- Agar manitol
- Agar Mueller Hinton
- Agar sangre
- Discos de optoquina, Bacitracina, Novobiocina
- Cloruro de Sodio al 6,5%

3)- Reactivos para la lectura de las reacciones bioquímicas.

4)- Estufas de 37° C.

5)- Ansa aguja y ansa ojal.

METODO

Primer día:

Siembra de los medios de cultivo para pruebas bioquímicas.

En cada uno de los medios indicados se procederá a inocular la cepa correspondiente en la forma que indicará el docente.

Todos los cultivos se llevarán a incubar a 37° C por 24-48 hs.

Segundo día:

Se procederá a la lectura de los resultados de las pruebas bioquímicas agregando los reactivos que las pruebas requieran y se registrarán los resultados en el cuadro siguiente:

RESULTADOS:

Germen problema

Reacciones y pruebas diferenciales	Lectura
Catalasa	
Coagulasa	
Manitol	
Fosfatasa	
Bilis esculina	
Hemólisis	
Tolerancia sal	
Susceptibilidad a la optoquina	
Susceptibilidad a la bacitracina	
Susceptibilidad a la novobiocina	
CAMP	
DNA asa	
- Identificación presuntiva:	

DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES MÁS FRECUENTES DEL GENERO STAPHYLOCOCCUS

BACTERIA	MANITOL	DNAsa	COAGULASA	NOVOBIOCINA
S.aureus	+	+	+	S
S. epidermidis	-	-	-	S
S.saprophyticus	+	-	-	R

S: sensible
R: resistente

DIFERENCIACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLÍTICOS

BACTERIA	BE	CINa	Bac	Hip	Pyr	HEMOLISIS	GRUPO SEROLOGICO
S.pyogenes	-	-	+	-	+	β	A
S.agalactiae	-	V	-b	+	-	$\beta\gamma$	B
S.Grupo C	-	-	-b	-	-	β	C
S.Grupo G	-	-	-b	-	-	β	G
Enterococos	+	+	-	V	+	$\alpha\beta\gamma$	D

BE: Bilis esculina
Bac: Bacitracina
Pyr: Pirrolidonil arilamidasa
+: reacción positiva
V: reacciones variables

CINa: caldo con 6,5% de CINa
Hip: Hipurato de sodio
-: reacción negativa
b: pueden presentarse algunas excepciones

DIFERENCIACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS NO BETA HEMOLÍTICOS

BACTERIA	OPT	SB	BE	CINa	Hip	Pyr	HEMOLISIS	GRUPO SEROLOGICO
S.pneumoniae	+	+	-	-	-	-	α	
S.bovis	-	-	+	-	-	-	$\alpha\gamma$	D
S.agalactiae	-	-	-	V	+	-	$\beta\gamma$	B
S.viridans	-	-	-b	-	-	-	$\alpha\gamma$	
Enterococcus sp	-	-	+	+	V	+	$\alpha\beta\gamma$	D

OPT: optoquina
BE: Bilis Esculina
Hip: Hipurato de sodio
+: reacción positiva
V: reacciones variables

SB: solubilidad en bilis
CINa: caldo con 6,5 % de CINa
Pyr: pirrolidonil arilamidasa
-: reacción negativa
b: pueden presentarse algunas excepciones

TRABAJO PRÁCTICO Nº 9

TEMA: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

FUNDAMENTO TEÓRICO

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos.

Estas pruebas definen la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una población bacteriana.

Los principales métodos utilizados para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico comprenden.

- Las pruebas de dilución (en tubos con caldo o en placas de agar)
- Las pruebas de difusión en agar (usando discos impregnados con antibiótico).

Cada método tiene sus ventajas y limitaciones. En cuanto a la prueba de sensibilidad por dilución en caldo, es una de las primeras que se llevó a cabo y aún hoy sirve como método de referencia porque permite la determinación cuantitativa de la sensibilidad al antibiótico pero es laborioso y costoso, por lo tanto se limita su uso para casos especiales.

Las pruebas de difusión en agar son más accesibles y de uso común en los laboratorios de diagnóstico clínico.

Debemos recordar que cualquier prueba de sensibilidad "in vitro", sólo da una idea aproximada de la acción inhibitoria contra los microorganismos, ya que la verdadera respuesta microbiana a los antibióticos es la respuesta clínica del paciente luego de administrada la dosis adecuada del antibiótico.

INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Cualquier prueba de sensibilidad, en general, se indica para todo microorganismo causante de un proceso infeccioso que necesite tratamiento antimicrobiano y cuya sensibilidad no puede ser predecible.

Existen microorganismos que muestran sensibilidad variable a los antibióticos de uso común: Estafilococos, Enterobacterias, Pseudomonas, Enterococos y otros bacilos Gram negativos no fermentadores.

Algunos gérmenes poseen sensibilidad predecible como: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, frente a penicilina, entonces no sería necesario realizar la prueba de sensibilidad. En el caso que el paciente sea alérgico a la penicilina, puede probarse la sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos.

Existen otros gérmenes que eran considerados sensibles a la penicilina como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, de los cuales han surgido cepas resistentes a estos antibióticos, por lo tanto se prueba su sensibilidad.

No se debe realizar la prueba de sensibilidad porque el resultado puede llevar a mal tratamiento cuando:

- se tiene mezcla de diferentes tipos de microorganismos.
- se aísla flora habitual
- la naturaleza de la infección no es clara.
- el microorganismo no tiene relación con el proceso a ser tratado.

Debe realizarse la prueba de sensibilidad a partir de una cepa aislada (cepa pura) utilizando varias colonias de aspecto semejante. Se debe evitar realizar el antibiograma en forma directa a partir del material clínico, excepto en las emergencias clínicas donde la coloración directa de Gram sugiere naturaleza monobacteriana. En este caso, debe repetirse luego usando la metodología estandarizada.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSION EN AGAR:

El método recomendado por el **CLSI** (ex **NCCLS** Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos), se basa en los estudios de Kirby y Bauer. Este es el método descripto de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio.

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel de filtro) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar formándose un gradiente de concentración.

La sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura, de la velocidad de duplicación bacteriana y del tamaño y fase de crecimiento del inóculo.

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente.

El primero en desarrollar una técnica fue Anderson que luego modifican Kirby y Bauer y es la que se usa actualmente, que permite realizar control de calidad y comparar los resultados.

Se basa en:

- 1- estandarizar los discos con antibióticos
- 2- estandarizar el medio de cultivo
- 3- estandarizar el inóculo
- 4- estandarizar el tiempo de incubación
- 5- medir los diámetros de la zona de inhibición.

TÉCNICA DE KIRBY - BAUER Y COLABORADORES:

Preparación de las placas con el medio de cultivo: Debe utilizarse agar Müller Hinton (no otro) controlando que el pH esté entre 7,2 y 7,4.

El agar Müller Hinton es el más indicado porque:

- Presenta buena reproducibilidad de resultados de lote a lote.
- Es pobre en contenido de timina o timidina (compiten con sulfonamidas, trimetoprimas y tetraciclinas), lo que daría falsas resistencias.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

Volumen: Se vierte 25 a 30 ml. de agar fundido en placas estériles de 100 mm. de diámetro, para obtener una altura de 4 mm. Esto es importante para evitar halos excesivamente reducidos o ampliados.

Secado: No debe haber gotas de condensación en el agar ni en la tapa. Para eliminar la humedad se colocan las placas de 15 a 30 min. a 37°C.

Las placas envueltas en bolsas de plástico pueden conservarse entre 4 y 8 °C de 4 a 7 días.

Preparación del inóculo: Se toman 3 a 10 colonias bien aisladas con un ansa y se introducen en 5 ml de caldo Tripteína Soya o solución fisiológica, se compara la turbidez con un testigo.

El **testigo** a usar corresponde al 0,5 de la escala de Mc Farland, que se logra con la siguiente fórmula:

0,5 ml. Cl₂Ba 0,048 M (1,175 % P/ V Cl₂Ba 2 H₂O) + 99,5 ml. SO₄H₂ 0,36 N (% V/V).

Siembra de las placas: se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo, presionando el algodón contra las paredes del tubo para escurrir el exceso de líquido. Se aplica el hisopo sobre la superficie de las placas estriando uniformemente y rotando la placa cada 60° para asegurar una completa distribución del inóculo. Espere de 3 a 5 minutos antes de aplicar los discos.

Los discos deben reunir las siguientes condiciones:

- un diámetro de 6 mm (según la marca comercial)
- no vencidos.
- debidamente refrigerados y protegidos de exceso de humedad durante su almacenamiento.

Los discos de penicilinas y cefalosporinas deben conservarse a - 20 °C para conservar su potencia, excepto la cantidad necesaria para el trabajo semanal que puede estar a 4°C.

Colocación de los discos: se realiza con una pinza estéril cuidando que tengan un buen contacto con la superficie del agar haciendo una ligera presión. Debe respetarse la distancia entre los discos para evitar superposición de zonas.

En placas de 100 mm. de diámetro colocar no más de 5 discos. Si se excede este número, puede que ocurra superposición de halos, lo que dificulta la lectura y pueden darse fenómenos de sinergismo o antagonismo. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar.

Selección de antimicrobianos: Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de agentes probados debe ser limitado. En general deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas relacionadas con actividad casi idéntica y para las cuales la interpretación podría ser la misma. Existen listas de antimicrobianos sugeridas para pruebas diarias, que se basan en factores microbiológicos, clínicos y farmacológicos.

Ciertas drogas se usan solo para infecciones urinarias, por lo tanto no deben probarse ni informarse en gérmenes aislados de otros materiales. Por ejemplo: Nitrofurantoína.

Medición de las zonas de inhibición: Después de 16 a 18 horas de incubación examine cada placa y mida los diámetros de la zona de inhibición con una regla o calibre, incluyendo el disco de 6 mm.

Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con el desarrollo invasor (*Proteus mirabilis* o *Proteus vulgaris*), se debe ignorar el ligero velo y medir el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente. Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no.

Cuando aparecen colonias aisladas dentro del halo de varios antibióticos con distinto mecanismo de acción, por ejemplo: Cloranfenicol, Fosfomicina y Gentamicina, corresponde a cultivos impuros por fallas en el aislamiento. En tal caso se debe efectuar antibiogramas por separado a cada especie.

Cuando las colonias aparecen en un solo antibiótico o en antibióticos muy relacionados (Penicilina y Ampicilina) se debe a bacterias previamente resistentes en la población usada como inóculo. Es prudente informar como resistente y sugerir la determinación de una CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) o una CBM (Concentración Bactericida Mínima) en caso que se desee administrar el antibiótico en cuestión.

Interpretación de los resultados: Para cada antibiótico ensayado puede concluirse que el germen es **Sensible**, de **Sensibilidad intermedia**, o **Resistente**, cotejando nuestras lecturas con las tablas.

SENSIBLE: esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones.

INTERMEDIO: esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas (por ej. Betalactámicos) o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado (por ej. Betalactámicos y Quinolonas en orina). Indicaría sensibilidad bajo ciertas condiciones.

RESISTENTE: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales.

Aunque siempre debe informarse sólo como **resistente** o **sensible**, se debe indicar al médico la existencia de antibióticos de **sensibilidad intermedia** cuando el germen presenta resistencia a todos los demás antibióticos ensayados o cuando el criterio clínico exija y aconseje su uso.

Control: Conviene realizar quincenalmente controles con cepas para las cuales los halos de inhibición son conocidos. Así se evalúa la calidad de los discos, medios y metodología usada.

Estas cepas son:

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

El contenido de Timina del medio de Müeller Hinton debe controlarse con discos de Trimetoprima sulfametoxazol frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

OTRAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Debemos recordar que la técnica de Kirby - Bauer es usada para microorganismos que desarrollan rápidamente y que no son nutricionalmente exigentes. Para gérmenes nutricionalmente exigentes, aerobios y anaerobios de desarrollo lento, aerobios, microaerófilos, etc., existen técnicas y metodologías especiales.

Por ejemplo: Para *Haemophilus influenzae*, el medio de elección es el Haemophilus Test Medium (HTM), contiene los siguientes ingredientes: agar M. Hinton, NAD, hematina bovina, extracto de levadura. Ajustar a pH 7,2 - 7,4.

Para **Mycobacterias**, se realizan antibiogramas en tubos o placas con distintos medios (agar Lowenstein Jensen, caldo Middlebrook 7H9, etc.), recordando que el período de incubación es prolongado.

Para **Anaerobios**, se realizan antibiogramas por métodos de elusión de antibióticos en caldo. También suelen realizarse en placas empleando otras técnicas.

BIBLIOGRAFÍA

XVI Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra Alicia Rossi”. Servicio Antimicrobianos. Departamento Bacteriología. ANLIS “Dr. C. Malbrán. Bs.As. Argentina Abril 2002.

Curso: Antibióticos, el laboratorio y la clínica .Actualización. Cátedra de Bacteriología. FCEQyN.UNaM. 2007.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO:

OBJETIVOS:

Cada alumno preparará una placa y a partir de una cepa aislada realizará la técnica de Kirby-Bauer. Al día siguiente concurrirá al laboratorio a leer los halos de inhibición.

Materiales:

- ansa ojal.
- pinzas metálicas.
- regla.
- hisopos estériles.
- placas estériles.
- pipetas estériles.
- tubos estériles.
- medio de cultivo agar Müeller Hinton.
- solución fisiológica estéril.
- discos con antimicrobianos.
- microorganismos de ensayo.
- patrón de turbidez (escala Mc Farland).
- cepas control (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*).

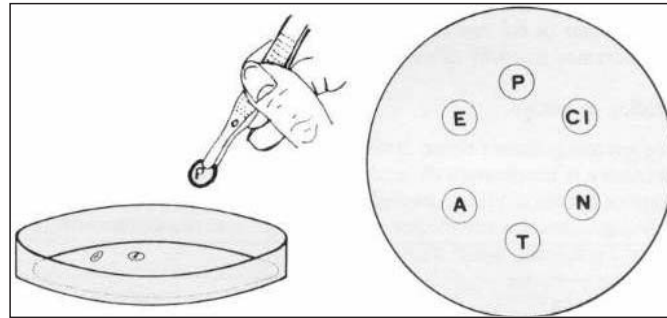
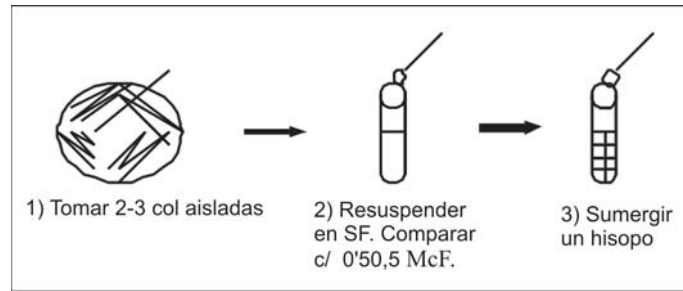
MÉTODO:

- a) Fundir el medio enfriar a 50 °C y distribuir en placas de Petri hasta una altura de 4 mm. (25 a 30 ml. para placas de 100mm.)
- b) Dejar solidificar y secar en estufa a 35 °C (si hay exceso de humedad en la superficie del agar), colocando las placas abiertas invertidas de 10 a 30 min.
- c) Preparar una suspensión del microorganismo en estudio, en caldo o solución fisiológica estéril, con una turbidez comparable al estándar (0,5 Mc Farland).
- d) Dentro de los 15 minutos de ajustada la turbidez, sumergir el hisopo estéril en la suspensión, presionar el hisopo contra la pared del tubo para remover el exceso de inóculo.
- e) Sembrar con el hisopo en la superficie del agar Müeller Hinton, diseminando muy bien. Repetir 2 veces más este procedimiento, rotando la placa unos 60° cada vez, para asegurar una distribución bien uniforme.
- f) Colocar los discos.
- g) Incubar a 35 °C durante 16 a 18 horas.
- h) Realizar este procedimiento también con una cepa patrón para controlar los discos.

RESULTADOS:

Verificar la sensibilidad de los microorganismos frente a los distintos antibióticos, midiendo con una regla el diámetro de la zona de inhibición completa incluyendo el diámetro del disco, y comparando con tablas estándar.

De acuerdo al resultado obtenido realizar el informe.



Disco	Antibiótico	Tamaño del halo de inhibición (mm)	Sensible (S)	Resistente (R)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

TRABAJO PRÁCTICO N° 10

RESISTENCIA BACTERIANA. BETALACTAMASAS

FUNDAMENTO TEÓRICO

El primer microorganismo que se convirtió en un serio escollo para el tratamiento del huésped infectado fue el estafilococo, ya que a los 2 años del empleo a gran escala de la Penicilina G se produjo la selección de estafilococos resistente a la misma. Desde entonces, la diseminación de la resistencia múltiple a los fármacos se ha convertido en un problema en los centros de salud y la comunidad a nivel mundial.

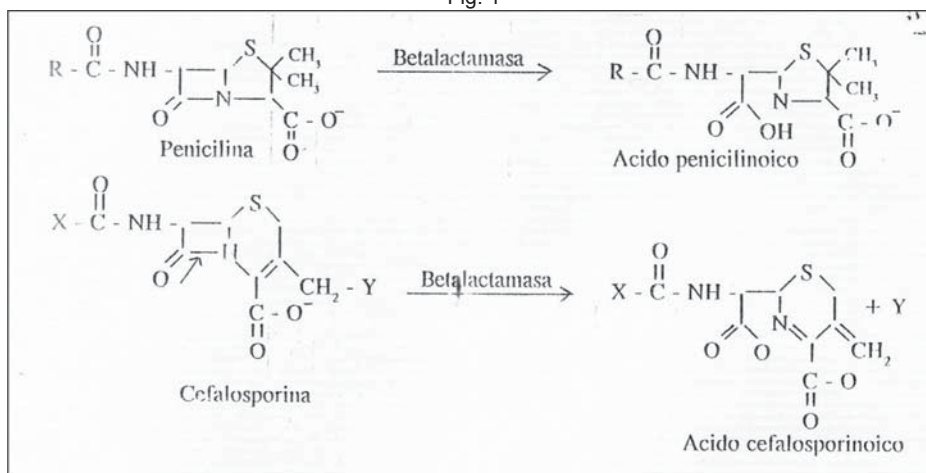
La resistencia a los antibióticos se ha demostrado para todos los organismos patógenos y virtualmente, no se conoce ningún antibiótico que se encuentre totalmente exento de ella. Las variaciones de la resistencia en las especies más comunes han sido similares en todo el mundo, reflejan la presión selectiva por los fármacos antimicrobianos de uso habitual.

Hay distintos mecanismos de resistencia, intrínseca o natural, o bien adquirida. Actualmente la resistencia mediada por plásmidos representa la mayoría de todos los problemas de este tipo, asociados a los gérmenes patógenos humanos. A su vez, la destrucción enzimática del antibiótico, es el arma más utilizada por las cepas resistentes y, dentro de estas enzimas las más numerosas e importantes son las BETALACTAMASAS, que hidrolizan los antibióticos betalactámicos, inactivándolos. Si se tiene en cuenta que estos fármacos son los más utilizados se comprenderá la magnitud del problema. No solo las cepas resistentes de gérmenes grampositivos producen betalactamasas, sino que virtualmente todos los bacilos gramnegativos forman también estas enzimas que a menudo, explican las resistencias que surgen frente a las cefalosporinas y los antibióticos betalactámicos más recientes.

BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son enzimas bacterianas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico e inactivan el antibiótico. Se ha demostrado la existencia de un gran número de betalactamasas cromosómicas, por lo menos tantas como bacterias, pero además existen betalactamasas plasmídicas.

Fig. 1



CLASIFICACIÓN

SEGÚN	TIPO
1- Sustrato que inhiben	a) Penicilinasas. b) Cefalosporinasas. c) Amplio espectro.
2- Localización	Extracelulares: Cocos Gram (+). Periplásmicas: Bacilos Gram (-).
3- Localización del ADN	a) Cromosómicas. b) Plasmídicas.
4- Perfil enzimático	a) Constitutivas. b) Inducibles.

A) BETALACTAMASAS MEDIADAS CROMOSOMICAMENTE

La mayoría aparecen en bacterias Gram (-) y pueden ser:

- 1- Constitutivas
- 2- Inducibles

1. Se llaman betalactamasas **CONSTITUTIVAS** a aquellas intrínsecas del cromosoma bacteriano, es decir que están presentes en el mismo género, especie, y subespecie bacteriana (se trata por lo tanto de un carácter genético) y contribuyen a delimitar el espectro de un antibiótico betalactámico. Las más importantes son las encontradas en género *Klebsiella spp.*

2. Existen otras betalactamasas cromosómicas que son **INDUCIBLES**. La inducción es el proceso que ocurre cuando algunos antibióticos se agregan a una población bacteriana originando un marcado incremento en la producción de betalactamasas. Esencialmente cualquier beta-lactámico podría actuar como inductor. Es decir que una bacteria que antes no era resistente, se puede hacer resistente por la producción de una betalactamasa.

Para las betalactamasas cromosómicas, la transmisión es directa y vertical, es decir, una célula madre produce una descendencia de células hijas con las mismas betalactamasas.

B) BETALACTAMASAS MEDIADAS POR PLASMIDOS

Este tipo de betalactamasas producidas por plásmidos, son de herencia vertical y horizontal, es decir pasan de madres a hijas, pero también del plásmido de una bacteria a otra, por lo que no son específicas ni de especie ni de género. Así, betalactamasas en un principio confinadas a un grupo bacteriano pueden hallarse en otras especies incluso taxonómicamente muy alejadas.

Las betalactamasas mediadas por plásmidos de las bacterias Gram (+) son diferentes de los Gram (-). Parecería que la transferencia de plásmidos entre Gram (+) y Gram (-) no ocurre, así como tampoco entre aerobios y anaerobios.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS

Muchos métodos han sido descriptos para la detección de la producción bacteriana de betalactamasas. Inicialmente, la mayoría de ellos fueron diseñados para las penicilinasas estafilocócicas, pero más recientemente han sido adaptadas para la producción enzimática en bacterias Gram (-).

Los métodos se basan en los cambios químicos producidos en la molécula de Penicilina y Cefalosporina al ser hidrolizado el anillo betalactámico por estas enzimas (Ver Fig. 1).

A)- Por formación de un grupo **CARBOXILO** extra, queda un compuesto diácido, el cual puede ser detectado usando un indicador de pH (**METODO ACIDIMETRICO**) ó por su habilidad para reducir el Iodo (**METODO IODOMETRICO**).

B)- Por cambio en la disposición de electrones en la molécula de una cefalosporina cromogénica al ser hidrolizada, observándose un cambio de color atribuido al producto final formado (**METODO CROMOGENICO**).

C)- Por detección microbiológica de la baja actividad antimicrobiana del producto formado (**METODO BIOLOGICO**).

A.1. MÉTODOS IODOMETRICOS:

Este método se basa en la capacidad que tiene el ácido penicilinoico y no la penicilina, de reducir el Iodo. Este ensayo es presentado por Perret en 1954, en el cual el producto ácido reacciona con el Iodo. El exceso de Iodo es medido por titulación con una solución de tiosulfato de sodio. Este método sufrió numerosas modificaciones, de las cuales adoptamos dos para utilizarlas en la práctica diaria de detección de betalactamasas en el Laboratorio Clínico.

A.1.1) Ensayo micro-iodometrico de Novick: Modificado por Thornsberry

Esta reacción ha sido calculada para medir la hidrólisis como la decoloración del complejo iodo-almidón, cuando la reacción se realiza en un medio que contiene estos elementos. Las técnicas iodométricas pueden realizarse de modo diferente pero todas se basan en el mismo principio: el poder reductor que presenta el producto final formado por la ruptura del anillo betalactámico sobre el iodo.

Todas las técnicas iodométricas utilizan como reactivos:

- **SUSTRATO:** que consiste en una solución de Penicilina 0,20mM en Buffer fosfato pH7 (u otras penicilinas en concentración 2-5 mg/ml).
- **SOLUCION DE ALMIDON** del 0,2-1 % en agua.
- **REACTIVO DE IODO.**
- **CULTIVO PURO** de 18-24 hs.de la cepa en estudio.

En una placa de microtitulación o en un tubo se coloca el sustrato y en el se resuspenden 4 a 5 colonias de cultivo y se agita, luego se deja la suspensión aproximadamente 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así que se lleve a cabo la reacción, luego se agrega la solución de almidón y una gota del reactivo de Iodo. La suspensión se volverá azul debido a la formación inmediata del complejo iodo- almidón. (Si el iodo se agrega prematuramente, la reacción enzimática puede detenerse y dar un falso negativo).

Luego de agitar la mezcla un minuto, una rápida decoloración nos indica la presencia de betalactamasas, debido a la reducción del iodo, el cual una vez reducido ya no tiene la capacidad de formar el complejo coloreado con el almidón del sistema. Si permanece azul por más de 10 min. la reacción se considera negativa.

A.1.2) Adaptacion en Gel de Agar:

La reacción se realiza en una placa de Petri que contiene en el gel-agar, el clásico sistema iodo-almidón y el antibiótico betalactámico que inicialmente da un color azul. Sobre ésta se realizan perforaciones en las cuales se siembra el inóculo bacteriano.

Al ser hidrolizado el antibiótico betalactámico por el crudo enzimático o el inóculo, el gel es localmente decolorado, dando un halo incoloro alrededor del pocillo.

CONSIDERACIONES GENERALES:

Para el método **IODOMETRICO**.

- 1- Se debe trabajar siempre con testigos positivos y negativos.
- 2- Se pueden ensayar cepas como: *Staphylococcus sp*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*.
- 3- cuando se trabaja con *Staphylococcus spp*. tener en cuenta la característica inducible de la enzima que poseen. Por lo tanto deben incubarse previamente una suspensión del germen con un disco de Oxacilina durante aproximadamente 2 hs. para favorecer la inducción de la betalactamasa. Luego realizar la detección.
- 4- Puede utilizarse Ampicilina como sustrato cuando se quiere detectar betalactamasa en los microorganismos: *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, debido a la actividad penicilinasas de algunas enzimas.
- 5- No deben utilizarse cultivos en caldo ni muestras clínicas (exudado vaginal o uretral), ya que pueden tener reductores inespecíficos del iodo que podrían dar falsos positivos.

CONCLUSIONES: El método **iodométrico** es un ensayo que brinda:

- Muy buena sensibilidad.
- Reactivos de bajo costo y disponibles en el mercado.
- Técnica de fácil realización.
- Punto final neto, bien definido.
- Resultado en el día.
- Convirtiéndose en una excelente técnica para ser elegida para la detección de betalactamasas en cepas de interés clínico en cualquier Laboratorio de Microbiología.

A.2. MÉTODO ACIDIMETRICO:

Estos métodos se basan fundamentalmente en medir la aparición del grupo ácido cuando el anillo betalactámico es hidrolizado. Así el producto formado puede medirse:

A.2.1) Método Directo:

Por titulación con álcalis o bien por cambio de color mediante un indicador de pH.

Esta modificación utiliza como reactivos :

- a) Una solución stock de penicilina
- b) Una solución de Rojo Fenol al 0,5 % con las que se elabora un **Reactivo para betalactamasa** mezclando partes iguales de a) y b), y ajustando el pH final a 8,5 con la aparición de un color Rojo Violeta.

La reacción de detección de betalactamasa se lleva a cabo en un tubo en el que se prepara una suspensión del germen en estudio en solución fisiológica a la que se le agrega la mezcla reactiva.

Luego de mantener la misma durante 15 min. a temperatura ambiente, se lee la reacción. Un resultado **positivo** se evidencia por la aparición de un color amarillo, debido al descenso de pH provocado por la aparición del grupo ácido, luego de la ruptura del anillo betalactámico. La permanencia de un color rojo- violeta indica una reacción **negativa**.

CONSIDERACIONES

Es un método que presentando ventajas similares al iodométrico no es usado en la práctica diaria por tener un punto final no bien definido y por ser crítico el ajuste a 8,5 de pH inicial.

A.2.2) Metodo Indirecto

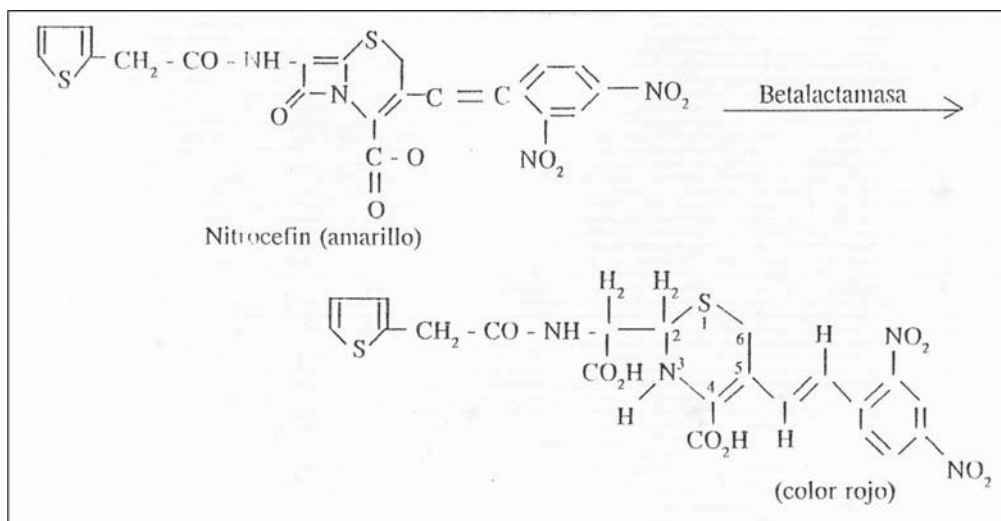
Medición manométrica de CO₂. De todas las modificaciones que sufrió este método a partir de 1950, desde el punto de vista práctico, la técnica más apropiada para uso en el laboratorio, es la planteada por Bauer y Denard (1976) inicialmente estandarizada para *Haemophilus influenzae*.

B) MÉTODO CROMOGENICO

El **nitrocefín** es una **cefalosporina cromogénica** descrita por O'Callaghan cuyo color amarillo es atribuido al sustituyente dinitrotirilo en la posición 3 de su molécula. Al ser hidrolizada por betalactamasas cambia su color al rojo intenso debido a una base de Shift cromogénica dada por la fuerte conjugación del anillo betalactámico y la doble ligadura en el anillo dihidrotiazina con el grupo dinitrotiril. Ver fig. 2.

Esta técnica utiliza como reactivo Buffer fosfato pH 7 y Nitrocefín, el cual se puede presentar en polvo, solución o discos. Cualquiera sea la presentación, la reacción se realiza colocando una gota del reactivo y realizando la suspensión del germen en él. A los 30 min. la aparición de un color rojo indica una **reacción positiva**, debido al cambio conformacional en la nube electrónica, al ser roto el anillo betalactámico. La permanencia de un color amarillo final indica una **reacción negativa**.

Fig.2



CONSIDERACIONES GENERALES

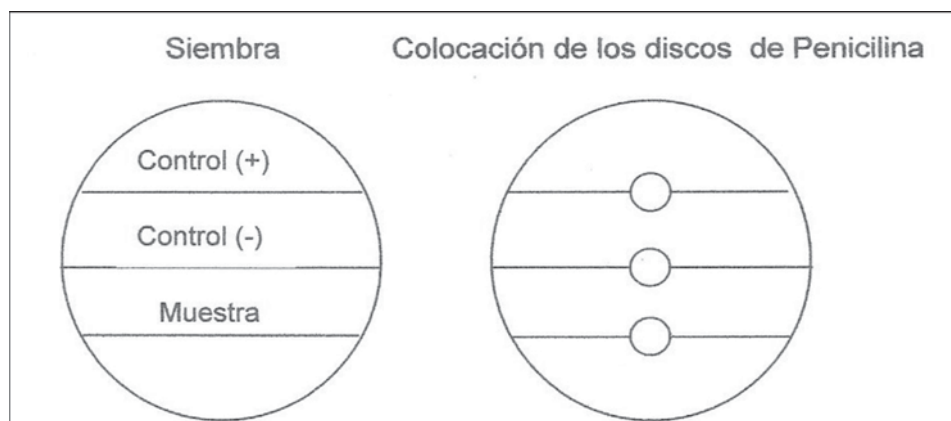
- 1- Es un método simple, rápido y el reactivo empleado es estable.
- 2- Puede usarse con iguales consideraciones de técnicas otra cefalosporina cromogénica: PADAC (Piridin-2-azo-p-dimetil-alanina).
- 3- El nitrocefín o el PADAC a pesar de ser cefalosporinas son hidrolizadas tanto por penicilinasas como por cefalosporinasas.
- 4- Es el método de **mayor** sensibilidad.
- 5- Es el método de elección para la determinación o de detección de producción de betalactamasas de *Hamophilus influenzae* tipo b, utilizando un inóculo denso y realizando la lectura final a los 30 min.

6- se utiliza para detectar betalactamasas en Enterococos, debido a su alta sensibilidad, ya que la producción enzimática en este género es de bajo nivel.

C) MÉTODO BIOLÓGICO

Este método utiliza agar *Mueller Hinton* fundido y enfriado a 50°C, al cual se le agrega la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* sensible a la penicilina, distribuidos en placas.

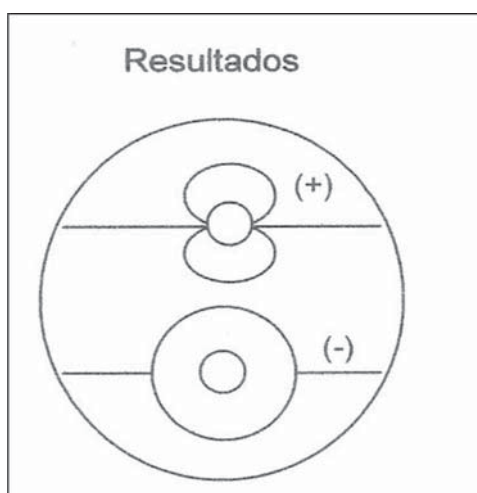
En la placa se siembran suspensiones de bacterias productoras de beta lactamasas (**control positivo**) y no productoras (**control negativo**) y las muestras incógnitas según el esquema:



Sobre estas líneas de siembra se colocan discos de Penicilina o tiras de papel impregnadas con la misma. Estas placas se incuban a 37 °C y se leen a las 24 hs.

La producción de betalactamasas se evidencia por la deformación del halo de inhibición que da la penicilina sobre el desarrollo de *Bacillus subtilis*, en la zona donde se cruza dicho halo con la estría de la cepa productora de betalactamasa. Ver fig. 4.

Fig. 4



Este método tiene una buena sensibilidad y puede ser utilizado para la detección de betalactamasas de Gram negativos y positivos, además permite utilizar distintos sustratos según el disco que se elija.

El inconveniente de esta técnica es el tiempo requerido para obtención de los resultados por lo cual no es muy usado en Laboratorios de Análisis Clínicos.

BETA LACTAMASAS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS

Las cefalosporinas de tercera generación son de gran utilidad en las infecciones graves del paciente hospitalizado, por su efectividad sobre un amplio espectro bacteriano, por su posibilidad de vía de administración parenteral u oral, por sus pocas reacciones adversas, etc.

La aparición de cepas productoras de betalactamasas plasmídicas es preocupante, no solo por la inutilidad del tratamiento individual con dichos fármacos, sino por la rápida diseminación que estas cepas tienen en el ambiente hospitalario.

Hacia fines de la década del 80 comienzan a aparecer en nuestro país mutantes de betalactamasas de espectro ampliado. Estas nuevas mutantes son capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, penicilinas y aztreonam, se denominan betalactamasas de **espectro extendido**.

MÉTODOS FENOTÍPICOS DE DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS

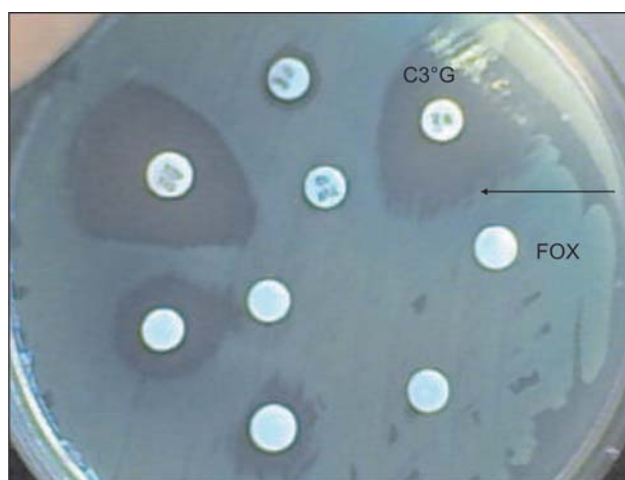
Han sido desarrollados con la finalidad de colaborar en el diagnóstico y en la búsqueda de estas enzimas sin recurrir a determinaciones moleculares y por lo tanto aplicables a laboratorios de poca complejidad.

Métodos fenotípicos para detectar betalactamasas tipo AmpC

La producción de betalactamasas AmpC cromosómicas inducibles puede detectarse en el laboratorio con el método propuesto por **Sanders** enfrentando un betalactámico inductor débil con un inductor fuerte.

Se puede enfrentar un disco de cefotaxima (CTX) y uno de cefoxitina (FOX) o eventualmente imipenem (IMP).

El achatamiento en el halo que se observa en el disco de CTX en las cercanías del disco de FOX o el de IMP nos indica la presencia de una cepa productora de beta lactamasas inducibles.



El antibiograma característico de un microorganismo productor de betalactamasa AmpC plasmídica muestra resistencia a la cefoxitina, a las cefalosporinas de 3º generación y a los inhi-

bidores de betalactamasas y susceptibilidad a los carbapenemes. Se puede observar sensibilidad a cefepime (cefalosporina de 4º generación).

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Típicamente, las BLEE son mutantes, betalactamasas plasmídicas derivadas de las antiguas betalactamasas de amplio espectro que han extendido su perfil de sustrato posibilitando la hidrólisis de todas las cefalosporinas, penicilinas y aztreonam.

Las cepas productoras de BLEE a diferencia de las productoras de AmpC son sensibles a las cefamicinas (cefoxitina), y al igual que éstas sensibles a los carbapenemes a no ser que esté asociado a otro mecanismo como la permeabilidad.

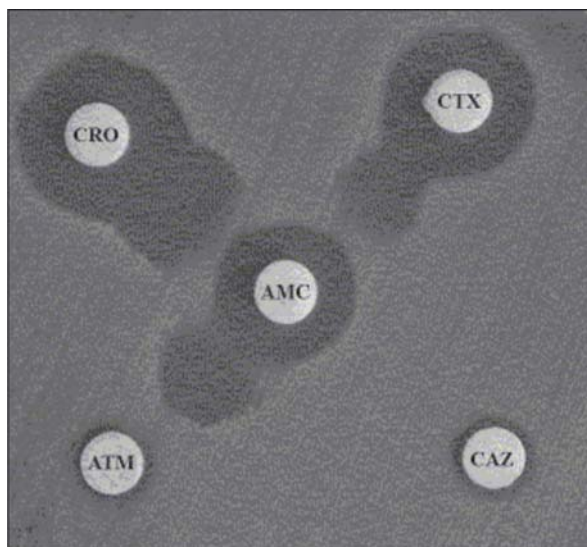
Se consideran sospechosas de BLEE a aquellas cepas que presenten los siguientes halos de inhibición CAZ=0 a 22mm, CTX=0 a 26 mm y cefpodoxima = 0 a 17 mm..

Método de Jarlier

En caso de ser la cepa productora de BLEE, los halos de inhibición se incrementan a colocar al lado de un disco de CTX y/o CAZ un disco que contenga ácido clavulánico (amoxicilina/clavulánico).

Si la cepa es productora de BLEE se observa la deformación del halo de inhibición el cual puede aumentar, o tomar una forma de “huevo” o “pelota de rugby” entre los discos.

La distancia entre los discos no debe ser menor a 20mm



BIBLIOGRAFÍA

- 1) XVI Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra Alicia Rossi”. Servicio Antimicrobianos. Departamento Bacteriología. ANLIS “Dr G. Malbrán. Bs.As. Argentina Abril 2002.
- 2) El creciente problema de la Resistencia Bacteriana Antibiótico Terapia 1989
- 3) Manual de Microbiología Clínica 4ª Edición . Lennette . Ballows. Hausler Trueant.
- 4) Curso: Antibióticos, el laboratorio y la clínica .Actualización. Cátedra de Bacteriología. FCEQyN. UNaM. 2007.

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

MÉTODOS IODOMETRICOS

A) ENSAYO MICRO-IODOMETRICO MODIFICADO DE THORNSBERRY

Reactivos:

1-Buffer fosfatos (0,1 M ; pH 7,0) .

Solución A: disolver 13,4 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada.

Solución B: disolver 6,85 gr de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada.

Mezclar 80ml de la solución A, con 45 ml de la solución B.

Ajustar a pH con la solución de fosfatos apropiada. Este reactivo es estable varias semanas a temperatura ambiente.

2-Solución de almidón. Puede utilizarse una concentración de 0,2 a 1 % en agua destilada.

Disolver el almidón pesado en el volumen correspondiente de agua destilada, para ello calentar la suspensión a baño María. No dejar hervir. La solución debe ser preparada en el día o guardarse refrigerada por no más de una semana.

3- Reactivo de Iodo (0,08 M de I_2 en 3,2 M de IK)

Pesar 2,0 gr de I_2 y 53,29 gr de IK en 100 ml de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente en envase de vidrio color caramelo. Esta solución es estable por varios meses (debe prepararse de nuevo cuando se observa un precipitado excesivo en la solución).

4-- Sustrato (0,20 mM).

Ejemplo: 0,5 gr de Penicilina en 83,3 ml de buffer fosfato pH 7,0 .Pueden guardarse alícuotas a -20°C y ser usadas por semanas o por el tiempo en que se obtengan resultados correctos utilizando controles positivos de actividad conocida. Pueden emplearse como sustrato otras penicilinas en una concentración de 2,0 a 5,0 mgr/ml.

PROCEDIMIENTO:

1- En una placa de microtitulación o en un tubo de Khan colocar 0,1 ml de solución de sustrato.

2- Resuspender en la solución de penicilina 4 o 5 colonias de un cultivo puro de 18 a 24 horas de la cepa en estudio. Agitar 30 segundos y dejar la suspensión aproximadamente 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así que se lleve a cabo la reacción.

3- Agregar 2 gotas de solución de almidón. Mezclar.

4- Agregar una gota de reactivo de Iodo. La suspensión se volverá azul debido a la formación inmediata del complejo Iodo - Almidón. Si el iodo se agrega prematuramente, la reacción enzimática puede detenerse y dar un falso negativo.

5- Agitar la mezcla 1 minuto .Una rápida decoloración indica la presencia de betalactamasas. Si permanece azul por más de 10 minutos, la reacción se considera negativa.

INTERPRETACION:

a) **Decoloración:** cepa productora de betalactamasas.

b) **Permanencia de color azul por 10 minutos:** Cepa no productora de betalactamasas.

B) MÉTODO IODOMETRICO EN TIRAS DE PAPEL

PREPARACION:

- 1- Preparar una solución de almidón al 0,2 % en agua destilada disuelto en agua caliente.
- 2- Enfriada esta solución, disolver en ella 1% de penicilina G potásica.
- 3- Embeber en esta solución papeles de filtro. Secar al aire por 2 horas. Cortarlos en tiras y conservar a -20°C por un año.

PROCEDIMIENTO:

- 1- Humedecer una tira con lugol de Gram. Inmediatamente tomará color azul oscuro (o púrpura)
Las tiras deben ser retiradas del frasco con pinza, en forma estéril.
- 2- Aplicar 8 a 10 colonias formando un círculo de unos 5 mm.
- 3- La decoloración de esta zona indica presencia de betalactamasas.

INTERPRETACIÓN:

Decoloración: cepa productora de betalactamasas.

No decoloración: cepa no productora de betalactamasas.

TRABAJO PRÁCTICO N° 11

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUAS- COLIMETRIA

FUNDAMENTO TEÓRICO

El agua es imprescindible para el desarrollo de la vida. Pero además de las funciones biológicas, el agua es un recurso clave para el desarrollo económico ya que interviene prácticamente en todas las actividades: agricultura, ganadería, industrias, servicios, etc.

También es valorada socialmente por sus múltiples usos y funciones: consumo doméstico, fuentes de energía, usos recreativos y medio de transporte, entre otros. Hoy, salvo en raros casos, el agua como se encuentra en la naturaleza, no puede ser utilizada directamente para el consumo humano ni para usos industriales, dado que no es lo suficientemente pura biológicamente ni químicamente.

La contaminación del agua tiene esencialmente cuatro orígenes bien definidos.

1°).- Los vertidos de aguas usadas de origen animal o humano. Las aguas residuales domésticas contaminan los ríos y aportan contaminantes constituidos por materias en suspensión, detergentes, materias orgánicas, fosfatos, bacterias y en algunos casos virus.

2°).- Los vertidos de aguas de los residuos industriales que pueden ser radioactivos o no, posibles cancerígenos, metales pesados, etc.

3°).- Aguas de lluvia que arrastran contaminantes de origen agrícola, abonos, pesticidas, detergentes, etc.

4°).-Contaminación accidental producida por vertido concentrado en materias contaminantes capaz de afectar las aguas superficiales y las napas profundas.

BACTERIAS PATÓGENAS TRASMITIDAS POR EL AGUA

Entre las bacterias patógenas que se han detectado en agua potable contaminada figuran: **Salmonella**, **Shigella**, **Escherichia coli** enterotoxigénica, **Vibrio cholerae**, **Yersinia enterocolitica**, **Campylobacter fetus**.

Las enfermedades que ocasionan pueden ir desde ligera gastroenteritis a casos graves o fatales de disentería, cólera o tifoidea. Si el agua usada para beber o bañarse contiene **Pseudomonas**, **Flavobacterium**, **Acinetobacter**, **Klebsiella**, **Serratia**, pueden producir infecciones de la piel y membranas mucosas de ojos, oídos, nariz y garganta.

Las dosis mínimas suficientes para causar enfermedades en el ser humano son muy variables:

- Unos 10^2 de **Shigella flexneri**
- Unos 10^6 de **Salmonella spp** para gastroenteritis.
- Unos 10^8 de **Escherichia coli** enteropatógena para gastroenteritis.

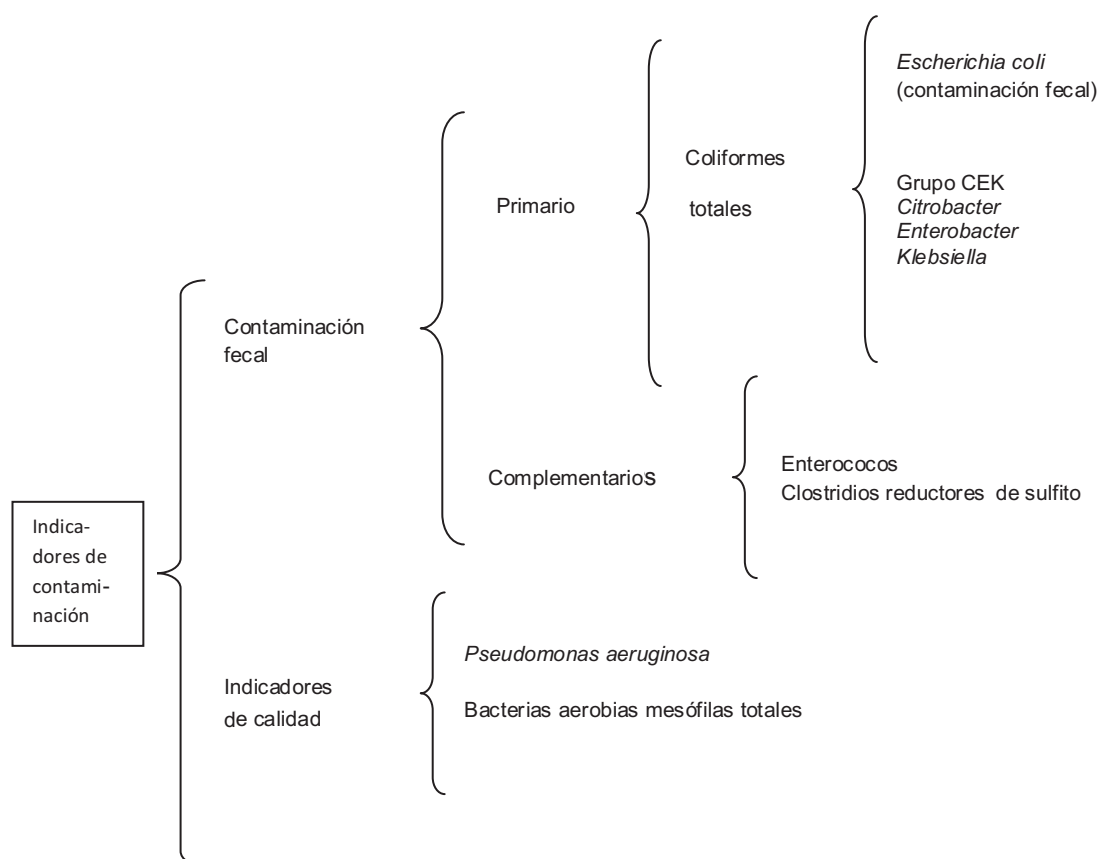
Estas dosis también están en función de la edad, estado nutricional y de salud en el momento de la exposición.

Los métodos utilizados para el aislamiento, identificación y numeración de los múltiples microorganismos patógenos suelen ser muy costosos, complejos y demandan demasiado tiempo.

Existen técnicas relativamente simples que si bien no aíslan microorganismos patógenos, detectan y enumeran microorganismos indicadores de contaminación, cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran permitir la proliferación de especies patógenas o toxigénicas. El indicador más

ampliamente utilizado para determinar la calidad bacteriológica del agua potable es el grupo de bacterias coliformes. El principal indicador de contaminación fecal humana o animal es *Escherichia coli*.

El grupo coliforme o coliforme total incluye todas las bacterias aeróbicas facultativas, Gram negativas, no esporuladas, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa a 35-37 °C con producción de ácido y de gas en menos de 48 hs. La definición incluye los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Éstos pueden no ser de origen intestinal y encontrarse en otros hábitat como ser el suelo, la vegetación y en intestinos de animales.



CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE AGUA POTABLE

Según el Código Alimentario Argentino, art. 982, el agua potable no deberá contener gérmenes patógenos y/o toxigénicos. Esta exigencia se dará por no cumplida si presenta:

- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (BAMT) a 37°C (placa de PCA) mayor a 100 UFC/ml.
- Coliformes: más de 3NMP/100ml.
- *Escherichia coli*: presencia en 100 ml.
- *Pseudomonas aeruginosa*: presencia en 100 ml.

Valores Nomaes para agua potable

Coliformes totales: < 3NMP/100 ml (CAA).

Escherichia coli: Ausencia en 100 ml.

Pseudomonas aeruginosa: Ausencia en 100 ml.

Enterococos: Ausencia en 100 ml.

BAMT: < 100 UFC/ml *.

* Si la determinación resultante se encuentra entre los valores de 100 y 500 UFC/ml, se recomienda una limpieza del tanque o fuente de reservorio de agua y luego se repite este análisis.

TOMA DE MUESTRA

Las muestras de agua deben extraerse en frascos de vidrio neutro, esterilizados, con tapa esmerilada y envoltura de papel, o en recipientes plásticos estériles (recolección bacteriológica) o bien en bolsas plásticas preesterilizadas.

El volumen de la muestra no debe ser inferior a 100 ml.

Cuando se trata de muestras de agua con cloro residual (agua corriente, piscina) los frascos deben tener alguna sustancia como tiosulfato que neutralice la acción del cloro, para evitar que su acción continúe durante el tiempo que transcurre entre la toma y siembra de la muestra. El tiosulfato en solución al 10% se adiciona al frasco antes de la esterilización en una cantidad tal que su concentración final en la muestra sea de 100mg/lit. Luego se deben esterilizar los frascos a calor húmedo o seco.

LUGAR DEL MUESTREO

Los sitios de muestreos y la frecuencia de los mismos, son factores críticos en la obtención de resultados confiables. Por lo tanto se debe tener en cuenta que las muestras sean representativas del agua en estudio.

1. Cuando se toman muestras de un grifo, se debe elegir el más próximo a la fuente principal de agua. Se debe elegir por ejemplo una canilla que esté conectada directamente a la red principal y que no esté servida a partir de un tanque o cisterna. Si se quiere controlar el tanque se deben realizar dos tomas de muestras, una sobre la cañería de alimentación y otra sobre la cañería de bajada del tanque. Se debe limpiar perfectamente la boca del mismo y luego se esteriliza el grifo con un hisopo de algodón embebido en alcohol o con una solución de hipoclorito de sodio (100 mg/lit), hacer correr el agua durante 1-2 minutos y por último se deja salir el agua moderadamente para recolectar en frascos adecuados tratando de evitar contaminación alguna.

2. Para tomar muestras de agua de un aljibe o pozo con bomba a mano, se bombeará agua durante alrededor de 5 minutos antes de hacer la toma. Si el pozo posee bomba automática se tomará la muestra del grifo de descarga, y en el caso de que no exista sistema de bombeo se introducirá la botella esterilizada provista de algún peso en la base tratando de evitar contaminación con la espuma superficial.

3. Para muestras de ríos, arroyos o lagos, se recomienda tomar la muestra no muy próxima a la orilla. Se sumerge el frasco hasta unos 20 cm por debajo de la superficie, dirigiendo la boca del mismo en sentido contrario a la corriente.

Se debe iniciar el examen bacteriológico de las muestras de agua inmediatamente después de su recolección o dentro de la hora siguiente; si se realiza el análisis después de una hora del muestreo (nunca después de las 24 horas), hay que mantener la muestra a baja temperatura durante el transporte al laboratorio en un recipiente de paredes aislantes y con hielo.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES

La prueba estándar para el grupo de coliformes puede realizarse mediante dos técnicas:

- 1.-Método del Número Más Probable o de Tubos Múltiples (NMP).
- 2.-Método de la membrana filtrante (FM).

1.-MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

Consiste en agregar una cierta cantidad de agua o leche, convenientemente diluida a medios de cultivos selectivos y que contienen lactosa como fuente de carbono y de energía y sustancias de acción bacteriostática (como Bilis de buey o Verde Brillante), hacia las bacterias Gram (+). Así desarrollan solamente las bacterias del grupo coli.

Se preparan tubos de ensayo con dichos medios selectivos, colocando dentro de cada uno un tubito de fermentación de Durham invertido. Se siembran distintas diluciones del agua en estudio y se determina el número de tubos en los que se nota desarrollo de gas; se puede calcular así el número de bacterias coliformes presentes en la muestra, aplicando el cálculo de las probabilidades.

Sin embargo, la selectividad de los medios usados no es absoluta, por lo tanto es necesario efectuar otras pruebas para confirmar que las bacterias que han desarrollado sean efectivamente del grupo coli. Interesa además saber si se trata de *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*., Para ello se replica de los tubos que resultaron positivos a medios especiales, líquidos o sólidos según el método empleado.

Técnica Operatoria

El agua en examen se debe diluir con caldo Mc Conkey de manera de obtener una baja, media y alta dilución. La baja dilución se efectúa con caldo de doble concentración, la media y alta dilución con caldo de concentración simple.

Se debe agitar vigorosamente las muestras y/o diluciones aproximadamente 25 veces.

Para determinar el NMP de coliformes en agua potable, por ejemplo se debe sembrar:

- 5 tubos conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey doble concentración con 10 ml de agua (dilución baja).
- 1 tubo conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey simple concentración con 1 ml de agua (dilución media).
- 1 tubo conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey concentración simple con 0.1 ml de agua (dilución alta).

En esta forma es posible poner en evidencia concentraciones de bacterias comprendidas entre 2 y 240 en 100 ml de agua (ver Tabla N° 2).

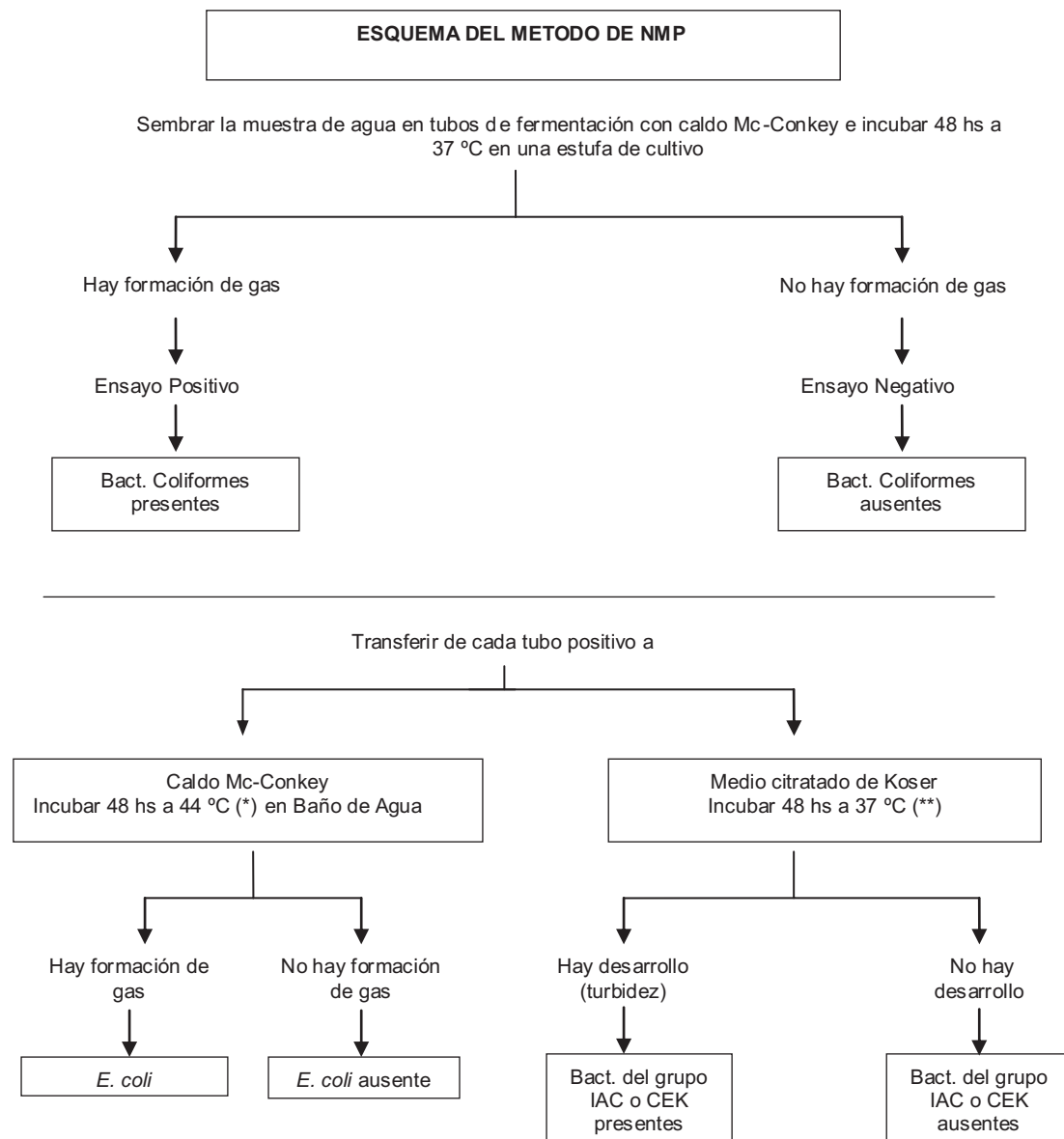
Según se trate del estudio de agua de río, agua potable, agua de pozo, agua de un grifo, (aguas más puras o más contaminadas), se harán distintas diluciones y distintas

combinaciones de siembra de manera de poner en evidencia concentraciones de bacterias que estén comprendidas en las tablas.

El número de tubos que se inoculen con 10 ml y el de tubos que se inoculen con 1ml de muestra o 1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , etc., dependerá del contenido bacteriano que se sospeche contiene el agua que se analizará.

Para poder hacer las lecturas será necesario obtener algunas reacciones negativas y de esta manera lograr un resultado definido para el NMP y no un “mayor a”.

Los tubos se incuban por 48 hs a 37 °C.



(*) Con ansa ojal de no menos de 3 mm de diámetro.

(**) Con ansa aguja para no arrastrar medio de cultivo pues pequeñas cantidades de peptona pueden permitir el desarrollo de *E.coli* que invalidaría los resultados.

Las tablas del NMP se basan en una hipótesis de la distribución de Poisson (dispersión aleatoria) para lo cual las muestras se deben agitar adecuadamente para evitar agrupamientos de bacterias en las porciones a sembrar.

Este método nos permite informar sobre la distribución cuantitativa de los distintos grupos de bacterias coliformes presentes en la muestra. La precisión de cada tubo depende del número de tubos utilizados obteniéndose una información más satisfactoria cuando mayor inóculo de la muestra estudiada se utilice.

La producción de acidez se evidencia por cambio de color de violeta a amarillo, y la producción de gas por la acumulación de gas al menos en un 10% del volumen total de la campanita.

Así se deduce:

El número más probable (N.M.P.) de bacterias coliformes totales en 100 ml de muestra, se obtiene de acuerdo con el número de porciones sembradas y con el número de tubos que

producen ácido y gas en caldo Mc Conkey incubado a 37°C a partir de tablas de probabilidad estadística.

El número más probable de *Escherichia coli*, se obtiene de acuerdo a la cantidad de tubos positivos de caldo Mc Conkey incubados a 44°C.

El número más probable de I.A.C., se obtiene de acuerdo al número de tubos positivos en medio citratado de Koser.

Los resultados se buscan en la misma tabla y dependerá de acuerdo a las diluciones realizadas de las muestras, el número de tubos sembrados y el número de tubos positivos.

Con el siguiente ejemplo se ilustra el manejo de las tablas

- Supóngase que de la siembra de 5 tubos conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey doble concentración con 10 ml de agua, resultan positivos **3 tubos**
- De la siembra de 1 tubo conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey simple concentración con 1 ml de agua, no hay evidencia de desarrollo, **0 tubos**
- De la siembra de 1 tubo conteniendo 10 ml de caldo Mc Conkey concentración simple con 0.1 ml de agua, resultado positivo **1 tubo**

Entonces la combinatoria a usar es **3 0 1** para ir a tablas

Números de tubos (+)	NMP (tabla 1)
Coliformes totales 3 0 1	n=12

Luego de repicar los tubos que resultaron positivos para coliformes totales, siguiendo el esquema de Wilson, se obtiene la siguiente combinatoria : **2 0 0** para coli fecales y **3 0 0** para I.A.C.

Coliformes fecales	2 0 0	a= 5
Grupo C.E.K	3 0 0	b= 8,8

Cálculos:

$$\text{NMP/100 } E. coli = (a/a+b) n = (5/5+8.8)12 = 4,35$$

$$\text{NMP/100 I.A.C} = (b/a+b) n = (8.8/5 + 8,8) 12 = 7,65$$

Los resultados se informarán de la siguiente manera

Bacterias coliformes totales (NMP/100 ml):	12
<i>Escherichia coli</i> :	4,35
Grupo IAC (NMP/100ml):	7,65

PRUEBAS CONFIRMATORIAS

De un tubo de caldo Mac Conkey simple concentración, incubado a 44°C, que haya dado reacción positiva se siembran placas con medio EMB (estriando la superficie del medio para aislamiento) se incuba a 37°C durante 24 horas y de las colonias aisladas se elige una de color negro verdoso con brillo metálico (característica de las *E. coli* en este medio).

Realizar una suspensión en solución fisiológica estéril y posteriormente sembrar con ansa ojal en estrías en tubos con agar tripteína soya, se incuba a 37°C durante 24 horas. Así tenemos una cepa pura, que ha desarrollado en forma suficiente como para poder realizar las pruebas bioquímicas.

Se usan generalmente cuatro pruebas que se denominan colectivamente I M Vi C. Ellas son: indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato de sodio.

La *E. coli* característicamente presenta los siguientes resultados:

Indol: Positivo
RM: Positivo
VP: Negativo
Citrato: Negativo

Las colonias que son rosadas y dieron Indol (-), Rojo de Metilo (-), Voges Proskauer (+) y citrato (+) pertenecen a coliformes del grupo IAC.

2.-MÉTODO DE LA MEMBRANA FILTRANTE (FM)

El número de coliformes totales presentes se puede determinar por filtración de volúmenes determinaos de muestras a través de MF.

Las MF son generalmente esteres de celulosa, de 47 mm de diámetro con poros de 0,45 µm que retienen no sólo las bacterias coliformes sino otras bacterias presentes en la muestra. Luego las membranas se colocan sobre el medio selectivo que contiene lactosa y embebe una almohadilla de fibra. Las cajas de Petri que contienen medio y membrana se incuban invertidas durante 24 hs. Las bacterias retenidas por la membrana filtrante se desarrollan, dando lugar a colonias visibles. Se contarán todas las colonias que presenten aspecto característico.

EXÁMENES MICROBIOLÓGICOS COMPLEMENTARIOS

Para determinar si un agua es potable, se completa la colimetría con la investigación de la presencia o ausencia de **enterococos**, de amplia distribución en el tracto intestinal humano y animal.

También se realizan ensayos que determinan la presencia o ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***. Son bacterias oportunistas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se hallan con cierta frecuencia en aguas cloradas de red, incluso en ausencia de coliformes.

La presencia de ***P. aeruginosa*** en los sistemas de almacenamientos, tanques y cisternas debe investigarse en las redes expuestas a contaminación o cuando se comprueba inconvenientes en la cloración debido a la resistencia, viabilidad y bajo requerimiento de éstas. Es causante de graves infecciones, hace que se descalifique una muestra de agua para su consumo aunque el número de coliformes sea aceptable.

Los anaerobios esporulados están en las heces en menor número que el coliforme fecal y sus esporas pueden sobrevivir más tiempo y también son más resistentes a la cloración normal. Por ello la detección de **Clostridios reductores de sulfito** es indicio de contaminación fecal, y en ausencia de coliformes fecales es apta la presunción de contaminación orgánica antigua o intermitente.

RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS TOTALES

Se realiza la siembra de la muestra, realizando diluciones o no, según la naturaleza del agua. Las muestras de aguas profundas o de superficies purificadas, se sembrarán directamente y además diluidas 1:10. Para las aguas superficiales no purificadas, se emplean diluciones al 1:10; 1:100; 1:1000, según el grado de contaminación. Las muestras o diluciones se deben mezclar cuidadosamente durante unos 25 movimientos completos.

Se coloca en una caja de Petri esterilizada, 1 ml de la muestra o de la dilución correspondiente. No debe transcurrir más de 20 minutos entre el momento en que se inicia el pipeteo y la

adición del medio a las placas. Conviene realizar esta operación por duplicado para promediar los resultados obtenidos.

Se agrega a cada caja de Petri 15 ml de PCA (agar para recuento), fundido y enfriado a 42 - 45 °C. Con sucesivos movimientos rotatorios de la caja se logra una distribución uniforme de las bacterias en el medio.

Se deja solidificar. Se incuba a 37°C durante 48 hs con la placa invertida.

Transcurrido el período de incubación, se procede al recuento de colonias para el cual se seleccionan aquellas cajas que tengan un número de colonias comprendido entre 30 y 300 (Las cajas sembradas con agua sin diluir siempre se cuentan).

RECUEENTOS DE COLONIAS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Placas que presentan entre 30 y 300 colonias:

- Se calcula un número de colonias por mililitro o multiplicando el número promedio de colonias (N) por placa, por la dilución (Dil) usada: $N^{\circ} \text{ colonias/ml} = N \times \text{Dil}$
- Las colonias deben ser contadas rápidamente luego de la incubación. En caso de ser necesaria una demora, se guardan las placas entre 5 - 10°C por no más de 24 horas.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

En cuanto al número de colonias que se cuentan por placa, se debe:

- Registrar los dos primeros dígitos de la izquierda
- Redondear hacia arriba el segundo dígito, en los casos en que el tercer dígito desde la izquierda oscile entre 5 y 9.
- Usar ceros en caso de que el tercer dígito oscile entre 1 y 5.
- Ejemplos: 133 se registra como 130
166 se registra como 170
45 se indica como 45

PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

OBJETIVOS:

Conocer las metodologías del control microbiológico de agua potable según normas vigentes en el país.

IMPLEMENTACIÓN PRÁCTICA:

- 1- Se procederá a la realización del recuento de bacterias coliformes totales, coliformes fecales y bacterias del grupo IAC o CEK.
- 2- Cálculos e Informe de los resultados.
- 3- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales en placa.

MATERIALES:

- Tubos de vidrio provistos de campanitas Durham.
- Pipetas estériles de 1 y 10 ml estériles.
- Ansas de ojal y aguja.
- Baño termostático a 35 °C y a 44,5 °C.
- Cajas de Petri estériles.
- Tubos de vidrio estériles.
- Estufa de cultivo a 35 °C-36 °C.

MEDIOS DE CULTIVO

- caldo Mc Conkey de concentración simple
- caldo Mc Conkey de doble concentración
- medio citratado de Koser
- medio EMB
- medio Agar para recuento en placa (PCA).

DILUYENTE

- Agua de peptona al 0,1%.

METODOLOGÍA DE TRABAJO:

Sembrar:

- 5 tubos con 10 ml de caldo Mc Conkey doble concentración con 10 ml de agua (dilución baja).
- 1 tubo con 10 ml de caldo Mc Conkey concentración simple con 1 ml de agua (dilución media).
- 1 tubo con 10 ml de caldo Mc Conkey concentración simple con 0.1 ml de agua (dilución alta)

Incubar a 37° C durante 48 hs.

Luego se procede según el método del Número más probable (NMP).

Se informa:

N.M.P. de bacterias coliformes totales por 100 ml de agua.

N.M.P. de coliformes fecales *E. coli* por 100 ml de agua.

N.M.P. de CEK o I.A.C. por 100 ml de agua.

RECUESTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES

Técnica:

- Preparar las diluciones decimales correspondientes.
- Sembrar por duplicado, 1 ml con cada dilución en cajas de Petri, estériles.
- Añadir sobre el inóculo 15 ml. del medio de cultivo (PCA) fundido y termostatzado. Mezclar suavemente.
- Incubar los cultivos a 35-37°C durante 48hs.
- Recuento de colonias: multiplicar el número de colonias por la dilución correspondiente. (UFC/ml).

INVESTIGACIÓN DE *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

Según APHA para aguas.

Técnica adoptada por OSN.

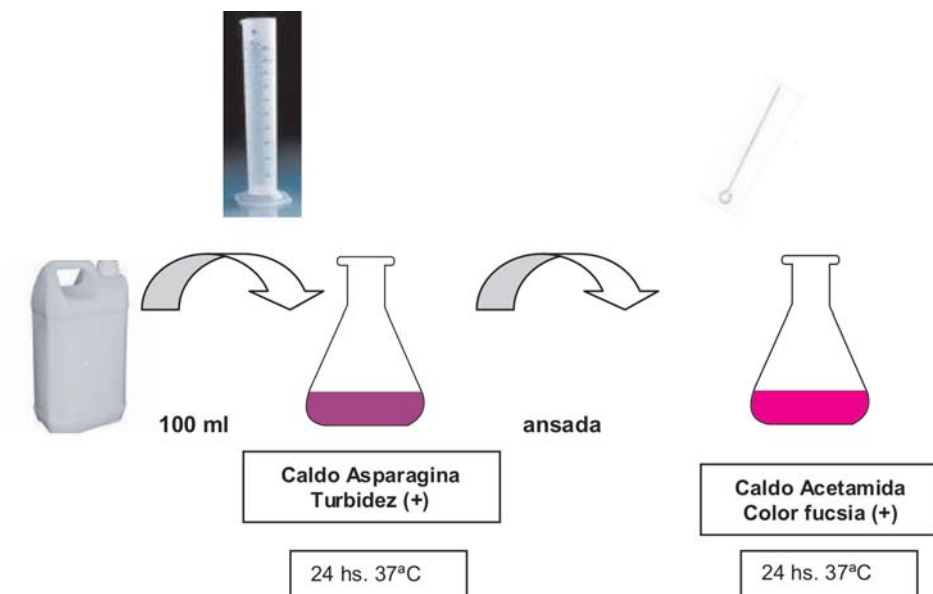


Tabla N° 1. Índice de NMP y Límites de aceptación del 95% para distintas combinaciones de resultados positivos cuando se usan 5 tubos por dilución (10 ml; 1ml; 0,1 ml)

Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza 95 %		Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza 95 %	
		Superior	Inferior			Superior	Inferior
0-0-0	< 2	-	-	4-2-0	22	9,0	56
0-0-1	2	1,0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1,0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1,0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1,0	11	5-0-0	23	9,0	86
1-0-1	4	1,0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2,0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3,0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	60	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1.600	600	5300
				5-5-5	>1600		

Tabla N°2 índice de NMP para agua de consumo.

Combinación utilizada:

5 tubos con 10 ml.

1 tubo con 1 ml.

1 tubo con 0.1 ml.

0-0-0	< 2,2
0-0-1	2,0
0-1-0	2,0
0-1-1	4,0
1-0-0	2,2
1-0-1	4,4
1-1-0	4,4
1-1-1	6,7
2-0-0	5,0
2-0-1	7,5
2-1-0	7,6
2-1-1	10,0
3-0-0	8,8
3-0-1	12
3-1-0	12
3-1-1	16
4-0-0	15
4-0-1	20
4-1-0	21
4-1-1	27
5-0-0	38
5-0-1	96
5-1-0	240
5-1-1	>240

ANEXO

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

MEDIOS DE CULTIVO:

Caldo Mac Conkey (doble concentración)

Bilis de buey desecada.....	10 g.
Lactosa.....	20 g.
Peptona de caseína	40 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g.
Agua destilada	1.000 ml.

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH a 7,4. Distribuir en tubos de vidrio provistos de campanitas Durham (10 ml/tubo). Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

Caldo Mac Conkey (simple concentración)

El caldo Mac Conkey doble concentración se diluye al medio. Repartir en tubos de vidrio provistos de campanitas Durham a razón de 10 ml/tubo. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

Medio Citrato de Koser

SO ₄ Mg.....	0,2 gr
PO ₄ Na ₂ NH ₄	1,5 gr
PO ₄ H ₂ K	1 gr
Citrato de sodio.....	3,0 gr
H ₂ O.....	1000 ml
pH: 6,7	

Caldo Asparagina

Asparagina DL.....	3.0 gr.
PO ₄ HK ₂	1.0 gr.
SO ₄ Mg 7H ₂ O.....	0.5 gr.
H ₂ O dest.....	1 ltr.

Caldo Acetamida

Acetamida	10.0 gr
ClNa.....	5.0 gr.
PO ₄ HK ₂	1.39 gr.
PO ₄ H ₂ K	0.73 gr.
SO ₄ Mg 7H ₂ O	0.5 gr.
Rojo Fenol	0.012 gr.
H ₂ O dest	1 lt.

BIBLIOGRAFÍA

- Diagnóstico Microbiológico. Bailey y Scott. Ed. Med. Panam. 7ª Ed. 1989.
- Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology. Buchanam R. H. y col. Ed. Williams an Wilkins. Baltimore. 1985.
- Diagnóstico Microbiológico. Koneman. Ed. Med. Panam. 1983.
- Manual Merck de medios de cultivos.
- Microbiología de los Alimentos y sus procesos de elaboración. Nickerson. Ed. Acribia. 1978.
- Métodos de laboratorio en Microbiología. Harrigan and McCance. Ed. Academia. 1968.
- http://www.portalplanetasedna.com.ar/el_agua.htm
- “Control Microbiológico de Aguas”. Curso de capacitación y entrenamiento. Amada Puciarelli Román. 2006.