

# **MICROBIOLOGÍA GENERAL DE FARMACIA**

## **Guía de Trabajos Prácticos Actualización**

**Martha Helena von Specht  
Liliana Rosalba Ybarra  
Lorena Beatriz Leguizamón  
Natalia Soledad Amerio  
Adriana Griselda Barboza  
Cecilia Rocio Martínez  
Manuela Liz Vereschuk**

Cátedra: Microbiología General

**Colección: Cuadernos de Cátedra**



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

Microbiología general de farmacia : guía de trabajos prácticos :  
actualización / Martha Helena von Specht ... [et al.]. - 1a ed. - Posadas :  
Universidad Nacional de Misiones, 2025.

Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-950-766-263-8

1. Microbiología. 2. Microorganismo. I. von Specht, Martha Helena  
CDD 571.2

## INDICE

Prólogo	4
Trabajo Práctico N°1. Métodos de esterilización y controles	5
Trabajo Práctico N°2. Microscopía y examen en fresco	32
Trabajo Práctico N°3. Tinción de microorganismos	46
Trabajo Práctico N°4. Medios de cultivo	61
Trabajo Práctico N°5. Siembra y aislamiento de microorganismos aerobios	80
Trabajo Práctico N°6. Siembra y aislamiento de microorganismos anaerobios	93
Trabajo Práctico N°7. Identificación de microorganismos	104
Trabajo Práctico N°8. Antimicrobianos	129
Trabajo Práctico N°9. Control higiénico de medicamentos	139
Anexo I. Cloro y compuestos clorados	160
Anexo II. Puntos de corte de antibióticos	162
Anexo III. Método de recuento	165

## **PRÓLOGO**

Esta guía de Trabajos Prácticos está destinada a los estudiantes de la Carrera de Farmacia de la Universidad Nacional de Misiones, la presente edición tiene como propósito acercarles un material de estudio específico, actualizado y acorde al plan de estudios.

La modalidad cronológica está diseñada para, contribuir de manera articulada con la teoría e introducir al estudiante en las aplicaciones de la microbiología en el ámbito farmacéutico.

Los contenidos se presentan de forma organizada, considerando la formación del profesional farmacéutico en el área de la microbiología.

Cada tema se aborda con objetivos y fundamentación teórica respaldada por bibliografía actualizada. En el ámbito del aula-laboratorio de microbiología se desarrollan los temas: esterilización, microscopía y coloración, siembra, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios y anaerobios, medios de cultivo, antimicrobianos y control higiénico de medicamentos.

Deseamos que este material acompañe al estudiante en su recorrido por la asignatura Microbiología General. Consideramos que facilitar los procesos de enseñanza y aprendizaje es fundamental para producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad, esto se logra mediante el acceso abierto brindado por la Editorial Universitaria de la UNaM.

Éxitos en este camino que transitaremos juntos.

Martha y Liliana

## TRABAJO PRÁCTICO N°1 MÉTODOS DE ESTERILIZACION Y CONTROLES

### OBJETIVOS

- Conocer diferentes metodologías de esterilización y sus controles.
- Adquirir entrenamiento en el acondicionamiento de diversos materiales de uso frecuente en el laboratorio de microbiología y contrastar criterios para otros establecimientos.
- Discutir la necesidad de protocolizar los procesos e incluir controles.

### INTRODUCCIÓN

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

Se entiende por **pérdida de la viabilidad** a la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción, sin que esto signifique necesariamente la destrucción o desaparición de la totalidad de las estructuras microbianas o de productos metabólicos derivados de estas. Por ejemplo, al esterilizar ciertos inyectables no pueden ser eliminados los pirogenos<sup>1</sup>.

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

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

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

A excepción de la filtración esterilizante, que se basa en la separación física de los microorganismos contenidos en un fluido, todos los demás provocan *in situ* la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción de los microorganismos expuestos. En estos casos,

---

<sup>1</sup> Un pirogeno o pirogénico es una molécula que causa fiebre. Algunas bacterias producen pirogenos conocidos como endotoxinas y exotoxinas. Las endotoxinas se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram-negativas y las exotoxinas son moléculas que algunas bacterias producen internamente y secretan externamente. Las endotoxinas y exotoxinas se liberan cuando una bacteria se lisa. Las endotoxinas se encuentran en forma de lipopolisacáridos (LPS) (Brock *et al.*, 2003).

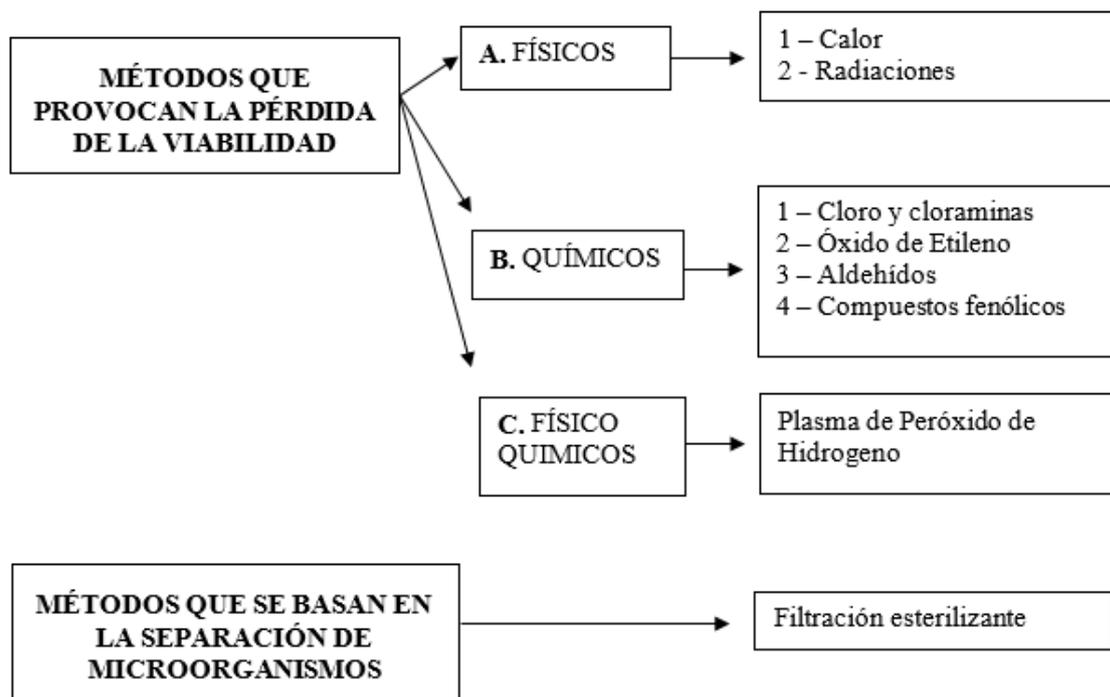
salvo excepciones, los productos de degradación microbiana permanecen asociados al objeto o sustancia ahora estéril y según el uso al que posteriormente se someta el producto, estas sustancias deben, o no, ser eliminadas o tratadas.

Los factores que afectan la eficacia de los procesos de esterilización son:

- Número de microorganismos
- Materia orgánica
- Tiempo
- Temperatura
- Humedad relativa
- Estandarización de la carga

Para que un método de esterilización sea efectivo debe ser reproducible, medible y controlable en cuanto a los parámetros considerados para garantizar la esterilidad.

## MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN



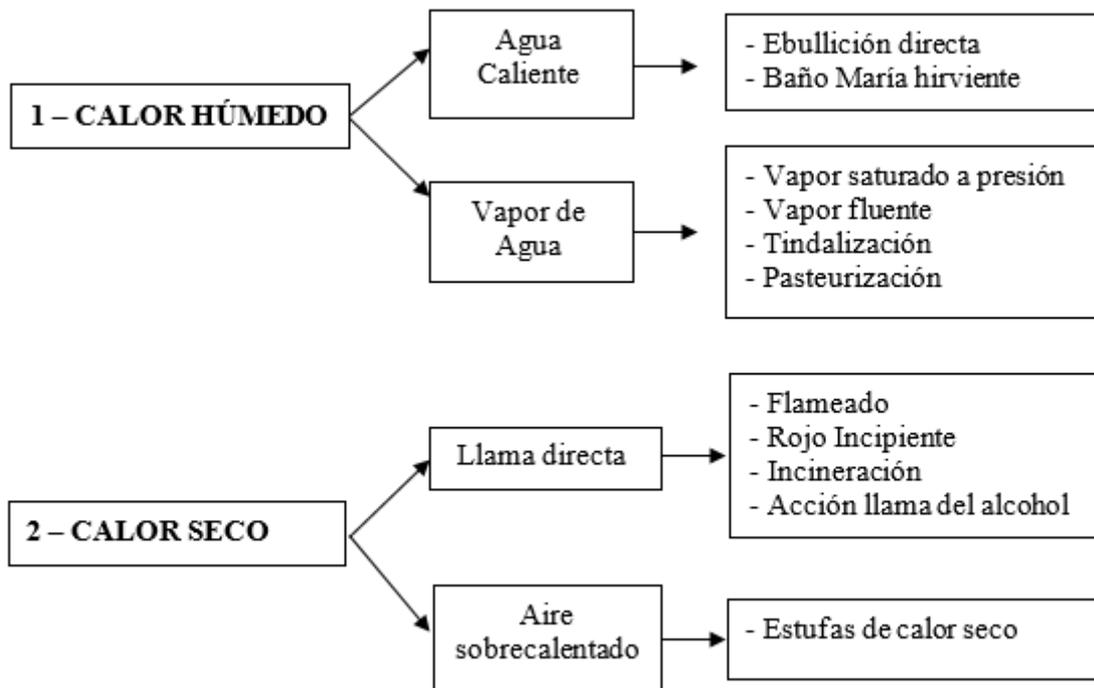
## MÉTODOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE LA VIABILIDAD

### A - MÉTODOS FÍSICOS

#### A.1 CALOR

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

1. Calor Húmedo
2. Calor Seco



Los métodos como ebullición directa, baño María hirviente y vapor fluente son difícilmente controlables y de muy baja eficiencia en muchos casos. No garantizan la pérdida de la viabilidad de los microorganismos. Sólo deben ser usados como excepción en caso de emergencia, o cuando no puede ser utilizado otro método.

Todos los microorganismos (aunque en distinto grado) son susceptibles a la acción del calor. El proceso es rápido cuando se realiza eficientemente, el calor llega a toda la masa, actuando en lugares del material que podrían no ser alcanzados por la acción de agentes químicos. El mecanismo de acción de este agente esterilizante, implica desnaturalización proteica, fusión y desorganización de membranas y/o la ocurrencia de procesos oxidativos irreversibles. Cada uno de estos procesos incide en distinto grado sobre la pérdida de la viabilidad, según el método de esterilización empleado.

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

Las variables principales de un proceso de esterilización por calor son:

- Tenor de humedad
- Temperatura
- Tiempo de exposición.

**LA CINÉTICA DE MUERTE MICROBIANA.** Describe la velocidad y el patrón con el que los microorganismos mueren en respuesta a un agente letal, como un desinfectante, un agente antimicrobiano o un proceso de esterilización. Este concepto es esencial en microbiología y en la industria, ya que proporciona información sobre la eficacia de los agentes antimicrobianos y ayuda a diseñar estrategias para controlar y eliminar microorganismos indeseados.

Cuando nos referimos al calor como agente letal, podemos obtener una **CURVA DE MUERTE TÉRMICA**, la cual representa cómo la población microbiana muere con el tiempo a una temperatura constante y específica durante un proceso de esterilización. En dicha representación gráfica el eje horizontal representa el tiempo (en minutos), mientras que el eje vertical muestra el logaritmo del número de microorganismos supervivientes.

El **cálculo del logaritmo de supervivencia** de microorganismos es una medida común en microbiología para expresar la disminución en la población microbiana después de un tratamiento térmico. La expresión matemática general para calcular el logaritmo de supervivencia es:

$$\log_{10} \left( \frac{N_t}{N_0} \right)$$

Donde:

$N_t$ : es la población microbiana después del tratamiento.

$N_0$ : es la población microbiana inicial antes del tratamiento.

Este cálculo mide cuántos órdenes de magnitud ha disminuido la población microbiana después del tratamiento en comparación con la población inicial. Un resultado negativo indica una disminución en la población, mientras que un resultado positivo podría indicar un aumento en la población (si es aplicable).

La curva de muerte térmica generalmente sigue una forma exponencial decreciente. El gráfico de muerte térmica es esencial en la determinación de dos parámetros clave, como el **valor D** (tiempo en minutos a una temperatura específica requerida para destruir el 90 % de los microorganismos) y **valor Z** (mide la variación de la temperatura requerida para afectar la eficacia del tratamiento térmico) (Figura 1).

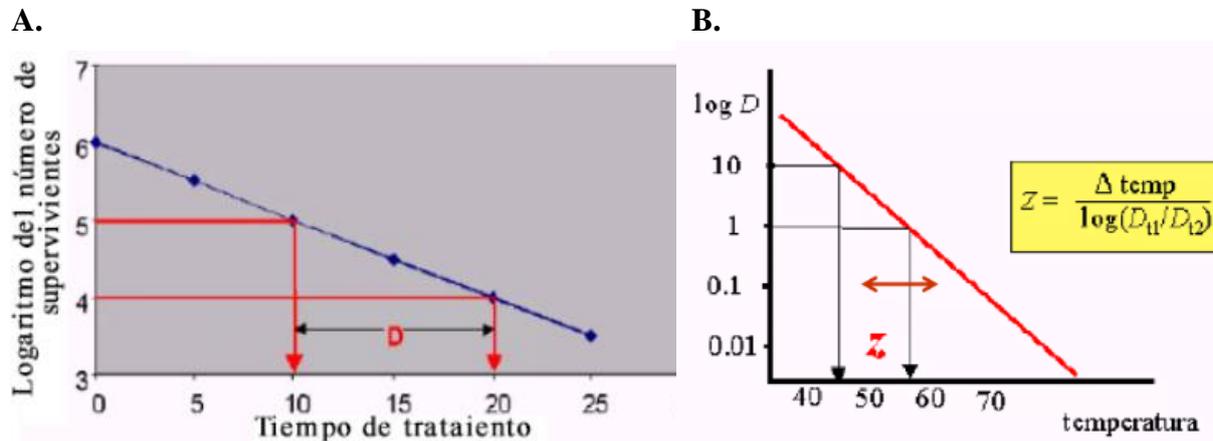


Figura 1: Curva de muerte térmica. A. ejemplo de cinética de termo destrucción; B. Cálculo del valor Z, donde:  $\Delta \text{ temp}$ : Incremento de temperatura;  $D_{t1}$  y  $D_{t2}$  valores de D a dos temperaturas estudiadas (Brock *et al.*, 2003).

El punto en el tiempo donde la curva comienza a descender indica el tiempo necesario para lograr una reducción significativa en la población microbiana. La pendiente de la fase logarítmica inicial proporciona información sobre la eficacia del tratamiento térmico. La forma y la pendiente de la curva pueden variar según el tipo de microorganismo, la temperatura aplicada y la duración del tratamiento.

**APLICACIONES EN ESTERILIZACIÓN:** La curva de muerte térmica se utiliza en la industria farmacéutica y en laboratorios para diseñar procesos de esterilización efectivos. La información derivada de estas curvas ayuda a establecer las condiciones necesarias para garantizar la destrucción eficiente de microorganismos patógenos y otros contaminantes.

### A.1.1 CALOR HÚMEDO

#### Vapor saturado a presión

El autoclave o estufa de vapor utiliza como **agente esterilizante** el **vapor de agua saturado** en un recipiente cerrado a presión y temperatura constante.

El **mecanismo de acción** del calor húmedo es la desnaturalización y coagulación de proteínas. La conformación nativa de muchas estructuras biológicas (DNA, RNA, proteínas, etc.) se estabiliza por uniones puente de hidrógeno entre distintos restos de la cadena peptídica. Estas

uniones son fácilmente reemplazadas por uniones puente de hidrógeno con moléculas de agua que es una especie química muy reactiva. Como consecuencia se forman productos tóxicos que podrían dañar a la célula.

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

El **método estándar** de esterilización o ciclo de esterilización en autoclave consiste en, vapor saturado a 1 atmósfera de presión, a 121 °C, durante 15 minutos.

El autoclave Chamberland simple, consta básicamente de las siguientes partes (Figura 2):

1. Tornillos móviles para el cierre hermético.
2. Elemento que debe ser esterilizado.
3. Canilla de desagote de la caldera.
4. Fuente de calor.
5. Gas.
6. Falso fondo con agua
7. Apoyo para alejar los elementos del agua.
8. Caldera.
9. Manómetros.
10. válvula de seguridad.
11. Espita.

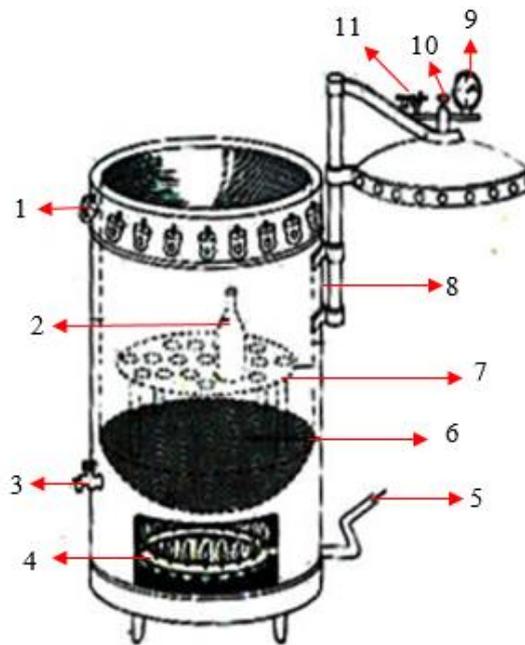


Figura 2: Autoclave Chamberland simple.

**Fuente de calor (4):** a gas o eléctrica.

**Cámara de esterilización (8):** por lo general cilíndrica, en cuyo fondo tiene un soporte (6) (falso fondo), debajo del cual se carga agua hasta un determinado nivel. Sobre este soporte (7) perforado se dispone de una canasta (o bandeja) para acomodar los materiales que deben esterilizarse. Ésta se cierra por la parte superior mediante una **tapa de bronce**, la cual posee 3 orificios: uno para el manómetro (9), otro para la espita (11), que controla la salida del vapor y el tercero para la válvula de seguridad (10) que funciona con un contrapeso o con un resorte. Estos elementos regulan el funcionamiento del equipo.

En el uso del autoclave es muy importante permitir que el vapor fluente desplaze totalmente el aire de la cámara de esterilización antes de que la presión aumente (regulando el cierre de la

espita). De no ser así, la presión resultante será la suma de las presiones parciales del aire y del vapor de agua. Teniendo en cuenta que para una misma presión la temperatura del aire es mucho menor que la del vapor de agua, la temperatura resultante será tanto menor cuanto mayor proporción de aire contenga la cámara.

Actualmente está muy difundido el empleo de autoclaves de tambor horizontal, con calentamiento eléctrico y control digital, que disponen de registros automatizados, de monitorización de la evolución del ciclo de esterilización.

### **Aplicaciones del método de esterilización por calor húmedo**

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

- **Medios de cultivo, agua destilada y soluciones farmacológicas.** En el caso de líquidos, estos NO deben formar emulsiones con el agua, como por Ej. aceites o vaselinas. En estos casos se esterilizan por calor seco, en estufa, teniendo la precaución de que la temperatura de esterilización no sea superior a la de la descomposición del aceite.
- **Textiles.** Algodón, hilo, fibras sintéticas, etc. La porosidad (el apresto) del tejido, puede dificultar el paso del vapor y la succión del aire por la bomba de vacío. Por ello se recomienda en el caso de ropa nueva llevar a cabo un lavado previo a fin de disminuir este riesgo, siempre que el autoclave esté provisto de un sistema de secado al vacío.
- **Vidrios o cristal.** en algunas ocasiones es preferible su esterilización por calor seco, pero es factible hacerlo también por vapor saturado.
- **Gomas y plásticos termorresistentes.** el material debe estar limpio y seco, a fin de asegurar la eliminación de materia orgánica.

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

- Rápido calentamiento y penetración del calor en el material a esterilizar.
- Pérdida de viabilidad de microorganismos (formas vegetativas y latentes) en corto tiempo.
- Escaso deterioro del material expuesto.
- No deja residuos tóxicos.
- Económico.

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

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua o que pudieran alterarse (talco).
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

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

- Eliminación total del aire de la cámara de esterilización.
- Llenado de recipientes hasta 2/3 de su volumen total, para los casos en que se esterilizan soluciones o medios de cultivo.
- Los materiales o recipientes deben tener la tapa floja, o estar tapados con algodón con una sobre tapa para permitir la ebullición libre y la liberación del aire evaporado.
- Con objetos porosos grandes, o grandes volúmenes de líquidos, se debe permitir un mayor tiempo de purgado o eliminación total del aire.

### **Normas generales para el uso correcto del autoclave**

- 1- Verificar el estado general del equipo y limpieza interior.
- 2- Llenar con agua la concavidad del fondo (no sobrepasar los orificios de la bandeja), colocar el falso fondo perforado y sobre éste los recipientes a esterilizar, debidamente acondicionados.
- 3- Colocar la tapa en posición, ajustando los tornillos móviles en cruz, para evitar el descentrado.
- 4- Abrir la espita (válvula de vapor) para permitir el purgado (salida del aire contenido en el interior del autoclave).
- 5- Encender el mechero (con la llama al máximo) el purgado se realiza durante 10-15 minutos desde el momento en que comienza la ebullición. Comprobar la total eliminación del aire, colocando un tubo de goma con un extremo a la salida de la espita y el otro extremo sumergido en un recipiente metálico conteniendo agua fría de tal modo que el sonido del burbujeo se hace metálico, con golpes secos del vapor que reemplazó al aire en su totalidad.
- 6- Retirar el tubo de goma del agua de control de borboteo
- 7- Cerrar la espita suavemente. Regular el mechero para un aumento regular y lento de la presión.
- 8- Una vez alcanzada definitivamente la estabilización de la indicación manométrica, en la presión de trabajo para la esterilización (1 atm), controlar su constancia, regulando la llama del mechero (fuego del mechero al mínimo o fuego corona).
- 9- Controlar el tiempo de esterilización a partir del momento de estabilización de la presión en el valor deseado, generalmente **1 Atm de presión, durante 15 minutos**.
- 10- Apagar el mechero.
- 11- Dejar enfriar completamente. Esperar a que se descomprima el aparato, el manómetro debe volver a cero.
- 12- Abrir la espita a fin de igualar las presiones dentro y fuera del autoclave.
- 13- Abrir los tornillos móviles en cruz.

14- Reponer el agua fría del fondo, si se esteriliza nuevamente, de lo contrario limpiar y secar perfectamente.

### **Evitar**

1- Purgado excesivo, ya que podría variar el volumen de los medios, soluciones, etc. Recuerde que está en ebullición.

2- Cerrar la espita en exceso. Las sales presentes en el agua y el efecto de la dilatación de los metales podrían hacer que no la pueda abrir con facilidad una vez finalizado el proceso.

3- Abrir el autoclave cuando la presión manométrica no se encuentra en cero. Recuerde que la presión que indica el manómetro está por encima de la normal. Es decir, esterilizar a 1 atm, significa a 1 atm por encima de la presión atmosférica normal (760 mm Hg o 1013 hPa).

La descompresión brusca: daña el aparato y desprende los tapones de tubos y Erlenmeyer.

### **Vapor fluente**

Para materiales, como medios de cultivo y sustancias, que no pueden soportar una temperatura mayor a 100 °C, se utiliza la acción del vapor fluente del agua a una atmósfera normal y mayor tiempo de exposición. Esta variación del método estándar consiste en dejar la espita abierta durante todo el ciclo de esterilización.

## **A.1.2 CALOR SECO**

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

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

Los **mecanismos de acción** del calor seco consisten en procesos oxidativos y de fusión de membranas por sobre la desnaturalización proteica. El calor seco produce desecación de la célula y efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos.

Debe permitirse la convección del aire colocando los paquetes de material a esterilizar de tal forma que permitan una buena circulación del calor seco.

La temperatura de esterilización puede variar entre 140-170 °C, requiriéndose distintos tiempos de esterilización (desde 5 horas a 140 °C hasta 1 hora a 170 °C). En caso de tratarse de material muy voluminoso o difícilmente penetrable por el aire, los tiempos deben ser aumentados. El papel y el algodón, así como el material acondicionado con estos elementos NO deben

esterilizarse a más de 160 °C ya que se carbonizan. Para material de vidrio: cajas de Petri, tambores con pipetas, etc. se utilizan 2 horas a 160 °C como **método estándar** de esterilización.

### Estufa de esterilización

Este equipo posee un dispositivo que produce el rápido movimiento de un volumen grande de aire caliente, facilitando la transmisión del calor directamente a la carga o paquete. Se utiliza menos tiempo y ofrece un equilibrio térmico.

La estufa de esterilización (Figura 3) es el equipamiento utilizado en los laboratorios para esterilizar por calor seco. Está compuesto básicamente por una doble cámara (1), el aire caliente generado por una resistencia circula por la cavidad principal y por el espacio entre ambas cámaras. Se mantiene una temperatura estable mediante termostatos de metal (3), que al dilatarse por el calor cortan el circuito eléctrico. Debe permitirse la convección del aire.

1. Doble cámara térmica
2. Rejillas para el material a esterilizar
3. Termómetro
4. Fuente de energía

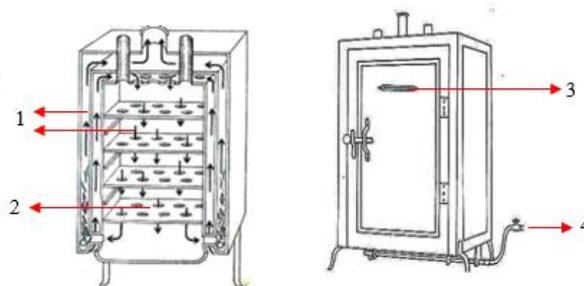


Figura 3: Estufa de esterilización

### Aplicaciones del método de esterilización por calor seco

- Instrumental cromado.
- Objetos de vidrio, aluminio y porcelana.
- Compuestos minerales termoestables en forma de polvo (talco, bórax).
- Instrumentos cortantes y de acero inoxidable (tijeras y pinzas).
- Agujas, jeringas de cristal, tubos, pipetas de vidrio, polvos estables al calor.
- Sustancias liposolubles e hidrófugas tales como aceites, silicona, parafina, vaselina, cremas.

### Ventajas del empleo de calor seco

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

- No humedece el material por lo que no requiere secado posterior.
- No erosiona el vidrio como lo hace el vapor.
- Facilita la penetración en sólidos, líquidos no acuosos y cavidades.

#### **Desventajas del empleo de calor seco**

- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del aire caliente.
- Su comportamiento con determinados metales es más oxidante.

#### **Normas generales para el uso correcto de la estufa**

- 1- Cargar la estufa en forma tal que permita la convección de aire sobrecalentado. Mantener alejado de las paredes el material a esterilizar.
- 2- Controlar la posición del termómetro (el bulbo no debe tocar la carcasa metálica ni la puerta) pues se podrían registrar temperaturas falsas mayores a las reales.
- 3- Encender y seleccionar la temperatura de esterilización: 160 °C - 180 °C.

### **A.2 RADIACIONES**

Las que se utilizan en la práctica, pueden ser ionizantes como los rayos Gama o no ionizantes como los rayos ultravioletas (Brock *et al.*, 2003).

#### **Radiaciones ionizantes**

Las radiaciones ionizantes producen la ionización del ADN de los microorganismos, de forma tal que se reducen, inactivan o se destruyen los microorganismos presentes en los materiales. Las **radiaciones gama** se utilizan dada su gran penetrabilidad, principalmente para esterilizar materiales termolábiles (por ejemplo, jeringas descartables, sondas, etc.) a escala industrial, ya que requiere la existencia de instalaciones complejas y costosas. No son utilizadas para medios de cultivo o soluciones proteicas porque se producen alteraciones de los componentes.

#### **Radiaciones no ionizantes**

La **radiación ultravioleta C (UVC) o radiación germicida** se utilizan comúnmente para esterilizar diferentes tipos de superficies y equipos. Requiere la existencia de instalaciones complejas y costosas. La radiación UVC afecta principalmente los ácidos nucleicos de los microorganismos, lo que lleva a la pérdida de viabilidad (Figura 4).



Figura 4: Luminaria UV

Las variables del método de esterilización son:

- La dosis a que se somete el material: depende de la longitud de onda
- El tiempo de exposición: 10 a 15 minutos

## B - MÉTODOS QUÍMICOS

Estos métodos se utilizan solamente en los casos en que los materiales no soportan el calor y su naturaleza lo permite.

### Químicos líquidos

La esterilización por agentes químicos por inmersión realizada de forma manual será siempre el último método de elección. Estos procesos son difíciles de controlar, con una gran probabilidad de re-contaminación durante el enjuague o el secado, aunque los equipos automatizados aumentan la seguridad del proceso de esterilización.

Dentro de los compuestos químicos se encuentran: *antisépticos, esterilizantes y/o desinfectantes*.

**Antisépticos (Bacteriostáticos):** Son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican. Ejemplo: alcoholes, sales de yodo; entre otros

**Desinfectantes y/o esterilizantes:** Son agentes antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que deben ser empleados sólo sobre materiales inertes. Ejemplo: cloro (ANEXO I), lavandina, óxido de etileno, entre otros.

Variables de esterilización por agentes químicos:

- Concentración del agente.

- Tiempo de exposición.
- pH.

### **C - MÉTODO FÍSICO-QUÍMICO**

Como el **Plasma de Peróxido de Hidrógeno**, un tipo de esterilización química, donde el peróxido de hidrógeno se convierte en el cuarto estado de la materia, que es el plasma, mediante ionización; la esterilización se realiza por oxidación de los componentes celulares de los microorganismos. Esta transformación se realiza a baja temperatura durante 45 a 60 minutos. Es especialmente adecuado para la esterilización de instrumentos y materiales sensibles al calor y a la humedad. Se usa generalmente para esterilizar dispositivos médicos como catéteres e instrumental quirúrgico. Requiere de equipamiento especializado (Figura 5).



Figura 5: Equipamiento Plasma de peróxido de hidrógeno

### **MÉTODO BASADO EN LA SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS**

#### **Filtración Esterilizante**

Las membranas filtrantes (Figura 6) son películas delgadas con poros de un tamaño determinado. Es fundamental elegir el sistema filtrante teniendo en cuenta la compatibilidad con los fluidos a filtrar.

El tamaño del poro va a depender del uso a que se va a someter el sistema. Tabla 1:

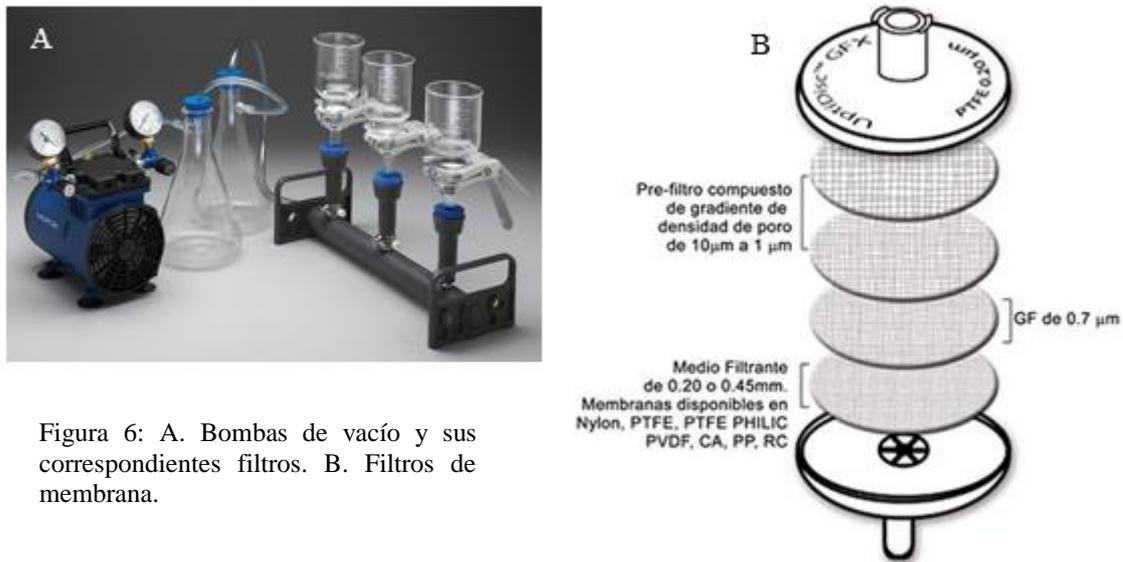


Figura 6: A. Bombas de vacío y sus correspondientes filtros. B. Filtros de membrana.

**Tabla 1: Membranas filtrantes**

Diámetro de poro	Usos
0,1 – 0,2 micras	Filtración esterilizante
0,45 micras	Análisis de coliformes en aguas
5 micras	Análisis de células en fluidos corporales

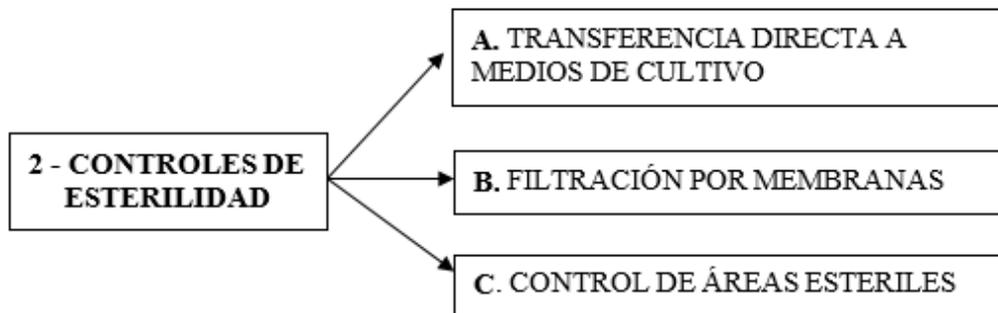
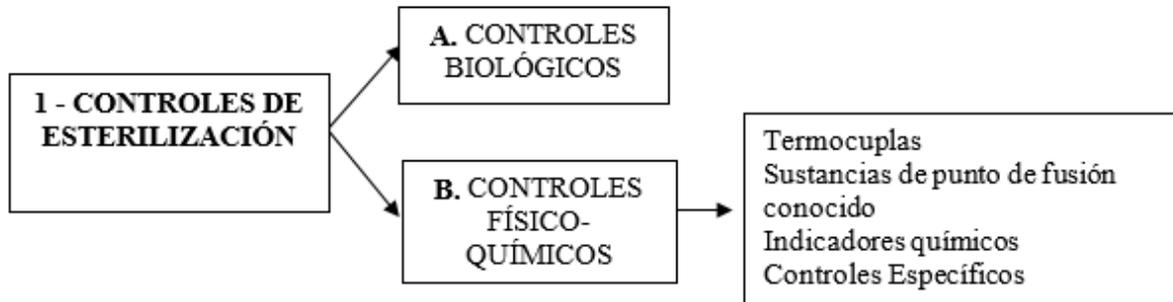
El tamaño de la membrana, va a estar relacionado con el volumen a filtrar, ejemplo las membranas de 13 a 25 mm de diámetro, van a ser utilizadas para volúmenes de 1 a 25 mL, normalmente contenidas en una jeringa.

### CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN Y DE ESTERILIDAD

Los controles aseguran que el proceso de esterilización utilizado ha sido el adecuado, así como también evalúan el buen funcionamiento de los equipos.

## 1. CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

Son aquellos controles que se realizan para determinar, si todas las condiciones del método empleado en la esterilización de un determinado producto u objeto fueron cumplidas, esto puede entenderse también como el control del buen funcionamiento del equipo.



### 1. A CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN BIOLÓGICOS

Están constituidos por cepas de microorganismos de resistencia conocida al agente esterilizante (Tabla 2), es decir una resistencia superior a la que presentan los contaminantes comunes, de tal manera que una suspensión de estos gérmenes colocados en lugares representativos del elemento esterilizante permita asegurar que su esterilidad representa un índice seguro de esterilidad del conjunto.

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

Para este método se disponen de ampollas comerciales, las cuales transcurrido el tiempo de esterilización se ponen a incubar junto a un control sin esterilizar, a 56 °C durante 24 a 48 horas.

**Tabla 2: Indicadores biológicos sugeridos por la Farmacopea Argentina 7ª edición vol III**

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	INDICADOR BIOLÓGICO
Vapor saturado a presión: Autoclave	<i>Esporas de Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953
Calor Seco: Estufa por calor seco	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372

## 1. B CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS

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

Se colocan en el interior de paquetes y envases y de ser posible en los sitios internos del producto.

### Controles de esterilización del autoclave

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

- **Pruebas de presión hidráulica:** Esta se realiza sometiendo al autoclave a un exceso de presión no inferior al 50 % de la presión de trabajo. Como resultado no se debe observar pérdida de líquido en ninguna de las conexiones, ni deformaciones en la cubierta, ni en el fondo.
- **Pruebas de vacío** (para control de hermeticidad): Se controla la seguridad de las válvulas y el tiempo de conservación de vacío en la autoclave cerrada, además se puede determinar las posibles fugas entre ambas cámaras, produciendo el vacío en una de ellas, con la válvula de comunicación cerrada y comparando la diferencia de presión. Se puede emplear también esta prueba para controlar la eficacia de la bomba de vacío, determinando el tiempo en que se logra la mínima presión.
- **Pruebas para el control de la distribución homogénea del calor:** Se utilizan termocuplas o termómetros de máxima convenientemente distribuidos en los puntos de dudosa homogeneidad.

## **2. CONTROLES DE ESTERILIDAD**

Los **controles de esterilidad** se fundan en un análisis estadístico que tiene por objeto revelar las contaminaciones por microorganismos. La experiencia ha demostrado que ningún proceso de esterilización, ni aun superando los ensayos de esterilidad, puede ofrecer absoluta seguridad sobre la separación de todos los gérmenes.

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

**Control de esterilidad del medio de cultivo:** Consiste en transferir una muestra representativa a medios de cultivo apropiados, que permitan el desarrollo de cualquier tipo de agente contaminante. Los medios y las condiciones de cultivo están especificados en la farmacopea.

**Test de promoción del crecimiento:** Se debe ensayar también la capacidad de los medios de cultivo utilizados para promover el crecimiento microbiano, con la finalidad de evitar falsos resultados. Se realiza con capas patrones proveniente de colecciones como American Type Culture Collection (ATCC) que presentan marcadas exigencias nutricionales.

### **2. B FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

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

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

El control de áreas estériles se realiza exponiendo placas de Petri con medio nutritivo sólido en diferentes lugares de los locales. Estas placas se dejan abiertas durante un tiempo variable (30-60'). El recuento de las colonias que resultan luego de la incubación permite estimar la eficacia de la esterilización y también las zonas de contaminación.

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

## SECUENCIA DE EVENTOS EN EL USO DE MATERIAL DE LABORATORIO EN MICROBIOLOGÍA

### 1. Descontaminación

Proceso físico o químico que permitirá remover o neutralizar los contaminantes que puedan haber quedado en forma residual sobre el material de vidrio y equipo utilizado. Esta operación también se realiza en todo material que ha contenido cultivos de microorganismos.

**La descontaminación es el primer paso para la limpieza de todo el material y/o equipo que haya sido utilizado con material infeccioso.**

- Tubos de ensayo, placas de Petri, frascos, Erlenmeyer etc.: **Autoclave 1 Atm., 121 °C, 30 minutos.**
- Pipetas: sumergir completamente durante un día en **solución desinfectante** (Formalina, Fenol, Lisol, Creolina, Hipoclorito de sodio al 5 %).

### 2. Limpieza

Es el proceso de remover, a través de medios mecánicos y/o físicos, el polvo, la grasa y otros contaminantes de las superficies, equipos, materiales, personal, entre otros.

La limpieza física remueve la materia contenida en el material biomédico, paso importante para permitir que actúen correctamente los agentes letales, como desinfectantes y esterilizantes que reaccionan e inactivan a los microorganismos.

Las prácticas de limpieza seguras son importantes para reducir la carga microbiana de las superficies de los equipos y dispositivos médicos. Debe tenerse en cuenta las recomendaciones del fabricante al momento de limpiar los equipos.

El manejo de los objetos contaminados debe ser mantenido a un mínimo.

Un requisito necesario para la limpieza es que cada objeto sea desarmado completamente antes de iniciar la misma.

**Para una buena limpieza se debe tener en cuenta**

- Tipo de acción del agente.
- Condiciones requeridas.
- Tiempo de contacto.

**Frecuencia de limpieza**

- Raspar para eliminar partes gruesas de suciedad.
- Hervir durante 10 minutos en solución jabonosa (o detergente).

- Cepillar individualmente cada pieza, en solución tibia.
- Enjuagar 5 a 8 veces con agua corriente (caliente si es posible). Para pipetas: Hacer pasar una corriente de agua a presión, conectándose a la canilla mediante un tapón de goma perforado.
- Enjuagar finalmente: 2 a 3 veces con agua destilada.

### **3. Secado**

Se realiza en canastos de alambre, colocando los recipientes boca abajo. A temperatura ambiente, o en estufa a 60-80°C.

### **4. Revisión**

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

### **5. Acondicionamiento del material**

El propósito de cualquier sistema de envoltorio es el de contener estos objetos y protegerlos de la contaminación. El material más comúnmente usado como envoltorio es el denominado **grado médico**.

Un paquete debe ser diseñado para permitir el fácil uso de su contenido, esto en lo relativo a su tamaño, ordenamiento interno, apertura aséptica, rótulo, etc.

- **Frascos con tapa esmerilada:** Envolver la parte superior o totalmente en papel. (si se esteriliza en autoclave, deberá colocarse una tira de papel entre la tapa y el cuello del frasco, para que permita el ingreso del vapor).
- **Tubos de ensayo:** La boca de cada tubo de ensayo se cubre con un tapón de algodón. El tapón debe quedar introducido en el tubo no debe quedar ni muy flojo ni muy apretado. Luego se disponen con la boca hacia arriba en canastos de alambre y se cubren nuevamente con papel grado médico.
- **Tubos de ensayo con tapa a rosca:** Tapar los tubos de ensayo con la tapa a rosca, sin ajustar, y luego se disponen con la boca hacia arriba en canastos de alambre y se cubren con papel grado médico.
- **Erlenmeyer:** La boca de cada Erlenmeyer se cubre con un tapón de algodón individual y sobre este se coloca una cubierta de papel grado médico.

- **Jeringas de vidrio y agujas metálicas:** Envueltas en papel o en tubos especiales. Previamente cubrir el émbolo con una delgada capa de vaselina líquida. (Si se esteriliza en autoclave, preparar las dos partes de la jeringa desarmada).
- **Hisopos:** Colocar 2 hisopos en el interior de un tubo de ensayo. La boca de cada tubo de ensayo se cubre con un tapón de algodón y se envuelve individualmente con papel grado médico.
- **Recipientes cerrados con tapa hermética:** acondicionar igual que los tubos de ensayo con tapa a rosca.
- **Recipientes de vidrio conteniendo: Cera, vaselina, aceites, talco:** acondicionar igual que los tubos de ensayo con tapa a rosca.
- **Placas de Petri:** Envolver con papel grado medico las cajas de Petri en forma individual o por grupo, invertir el paquete de tal forma que las cajas queden con la tapa hacia abajo. Rotular: grupo, fecha.
- **Pipetas:** En la boquilla de la pipeta se coloca a modo de filtro un tapón de algodón de 1,5 cm de largo, de tal forma que el aire pase libremente a través del algodón. Luego envolver cada pipeta con papel grado medico (Figura 7), evitando así el contacto con el medio externo luego de la esterilización. Rotular: graduación, volumen y con una flecha indicar el extremo de la boquilla.

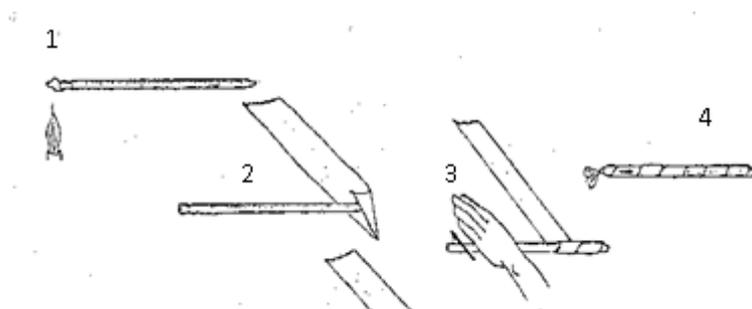


Figura 7: Acondicionamiento de pipetas

**6. Esterilización del material:** una vez acondicionado el material se procede a la esterilización.

#### **7. Conservación del material estéril:**

- Todo material que haya sido esterilizado en autoclave: secar el papel y tapones de algodón dejando en estufa a 37°C un día.
- Material con envoltura de papel rota o perforada: Envolver y esterilizar nuevamente.
- Todo material esterilizado será guardado en cajones o armarios a fin de evitar contaminaciones.

- Medios de cultivo: secar papel y tapones de algodón dejando en estufa a 37 °C durante 24 horas para control de esterilidad.
- Medios de cultivo serán conservados en la heladera (hasta que se observa desecación en los medios sólidos). Algunos medios no admiten conservación por largos períodos. Los medios comunes pueden conservarse a temperatura ambiente largos períodos si son tapados con tapones de goma esterilizados, bien ajustados.
- **Transcurrido de uno a tres meses sin haber utilizado el material, éste deberá volver a esterilizarse.**

A modo de síntesis, los pasos para obtener un material de laboratorio estéril, inicia con la descontaminación de los mismos, sigue con el lavado y secado correcto, el acondicionamiento para la esterilización, la esterilización propiamente dicha y posteriormente el guardado correcto del material estéril.

	<b>AUTOCLAVE</b>	<b>ESTUFA</b>	<b>CÁMARA DE ÓXIDO DE ETILENO</b>	<b>STERRAD® 100S</b>	<b>LUMINARIA UVC</b>
<b>MÉTODO</b>	Físico Calor húmedo	Físico Calor seco	Químico Óxido de etileno	Físico-químico Plasma	Físico Radiación no ionizante
<b>AGENTE ESTERILIZANTE</b>	Vapor saturado a presión	Aire sobrecalentado	Gas óxido de etileno (ETO)	Plasma de peróxido de hidrógeno	Luz UV 280-200 nm.
<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	Desnaturalización y coagulación de proteínas. El agua forma puentes de H y produce compuestos tóxicos.	Desecación de la célula y efectos tóxicos por elevado nivel de electrolitos.	Alquilación de las moléculas del M.O, impidiendo el metabolismo y reproducción del mismo.	Oxidación de componentes celulares de los microorganismos.	Formación de radicales libres, tóxicos que dañan el ADN.
<b>PARÁMETROS A CONTROLAR</b>	Tiempo y Temperatura. 15 min a 121°C 10 min a 126°C 7 min a 134° C	Tiempo y temperatura. 30 min a 180°C 60 min a 170°C 120 min a 160°C	Tiempo, temperatura, concentración y humedad. 2,5 h a 55°C ETO 100%	Duración del proceso:60 min. A T menor a 55°C. Entorno de poca humedad.	De 4 a 17 mJ/cm, durante 15 min.
<b>APLICACIONES</b>	Material termo resistente, medios de cultivo, soluciones farmacológicas, algodón, hilo, fibras sintéticas, vidrio o cristal, gomas y plásticos termo resistentes.	Instrumental cromado. Objetos de vidrio, aluminio y porcelana, y de acero inoxidable (tijeras y pinzas), agujas, jeringas de cristal, tubos, pipetas de vidrio, polvos estables al calor.	Cualquier artículo termolábil, teniendo la precaución de controlar la aireación, si el artículo es poroso.	Instrumentos y materiales sensibles al calor y la humedad. Ej.: Tubos de polietileno y teflón (PTFE) de un canal (excepto endoscopios flexibles).	Materiales termolábiles, jeringas descartables, sondas, no se usan para medios de cultivo porque alteran sus componentes.

## **LAVADO DE MANOS**

Una medida importante para disminuir la contaminación microbiana ambiental consiste en que el personal cumpla con los requisitos higiénicos adecuados a la función que realizan.

Siempre retirar anillos y pulseras; las uñas deben estar cortas y sin esmalte; las mangas de la ropa o de los uniformes deben ser cortas. Las manos deben lavarse con jabón común o con solución alcohólica, si no están visiblemente sucias, en las siguientes ocasiones:

- Al entrar y salir del trabajo.
- Al contactar con material contaminado, aunque se hayan utilizado guantes o manoplas.
- Antes y después de preparar instrumental.
- Antes y después de comer o beber.
- Antes y después de ir al baño.
- Después de quitarse los guantes.
- Al pasar de un área a otra de la central de esterilización.
- Al entrar y al salir de una sala de internación.
- Al entrar y al salir de un laboratorio de microbiología.

### **A. Técnica de lavado de las manos con agua y jabón: 40 a 60 segundos (OMS, 2008)**

1. Mojar las manos con agua corriente, si se utiliza jabón líquido. Si el jabón es en barra, tomarlo con la mano seca.
2. Aplicar jabón y distribuirlo por toda la superficie de las manos y dedos.
3. Friccionar al menos por 15 segundos fuera del chorro de agua corriente.
4. Enjuagar exhaustivamente.
5. Secar completamente con toalla de papel, descartable.
6. Cerrar el grifo con la toalla de papel.
7. Evitar el uso de agua caliente, porque incrementa el riesgo de dermatitis

### **B. Técnica de higiene de las manos con preparaciones alcohólicas: 20 a 30 segundos (OMS, 2008).**

En lugares donde no hay fuentes o suministro de agua, las soluciones alcohólicas están indicadas y alcanzan una buena acción antiséptica.

**El lavado de manos es el método más simple y efectivo para detener la diseminación de las infecciones, protegiéndose a sí mismo y a quien se asiste.**

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la obtención de materiales estériles, con el propósito de utilizarlos posteriormente en las prácticas microbiológicas.

### ACTIVIDAD N°1: ACONDICIONAMIENTO DE MATERIALES

**A) Para estufa:** Tubos de ensayo, placas Petri, Erlenmeyer, hisopos, pipetas y recipientes de vidrio conteniendo: cera, vaselina, aceites y talco.

**B) Para autoclave:** Tubos de ensayo, jeringas de plástico y recipientes de vidrio conteniendo agua destilada.

### ACTIVIDAD N°2: CONTROL BIOLÓGICO DE LOS PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN

#### a) Método clásico

#### Materiales necesarios

- **Microorganismos:** Papeles de filtro impregnados con esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372.
- **Medios de cultivo:** Disponer de 7 tubos de hemólisis esterilizados, con 3 a 5 mL del medio de cultivo.

#### Procedimiento

1. Colocar asépticamente en cada uno de los 7 tubos, una tira de papel de filtro impregnada en una suspensión de esporas de *B. atrophaeus* ATCC 9372 y someterlos a los siguientes tratamientos:

TUBO 1: Sin tratamiento (control de viabilidad de esporas)

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

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

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

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

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

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

2. Incubar cada tubo a 50 °C durante 7 días. Se realiza la lectura a las 24 horas y a los 7 días. Se procede a lectura e interpretación de los resultados.

## b) Método alternativo

Seleccionar de los controles de esterilización existentes en la catedra el más adecuado para los diferentes procesos de esterilización.

### ACTIVIDAD N°3: ESTERILIZACION

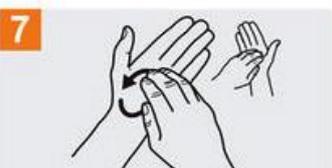
A) Realizar el proceso de esterilización estándar en estufa.

B) Realizar el proceso de esterilización estándar en autoclave.

### ACTIVIDAD N°4 TÉCNICA DE LAVADO DE MANOS

Realizar de manera individual antes de retirarse del aula laboratorio, la técnica de lavado con agua y jabón: 40" a 60" según OMS 2008.

 Duración de todo el procedimiento: 40-60 segundos

 <p><b>0</b></p>	 <p><b>1</b></p>	 <p><b>2</b></p>
Mójese las manos con agua;	Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de las manos;	Frótese las palmas de las manos entre sí;
 <p><b>3</b></p>	 <p><b>4</b></p>	 <p><b>5</b></p>
Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa;	Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados;	Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos;
 <p><b>6</b></p>	 <p><b>7</b></p>	 <p><b>8</b></p>
Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo, atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa;	Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación y viceversa;	Enjuáguese las manos con agua;
 <p><b>9</b></p>	 <p><b>10</b></p>	 <p><b>11</b></p>
Séquese con una toalla desechable;	Sírvase de la toalla para cerrar el grifo;	Sus manos son seguras.



## CUESTIONARIO GUÍA

**Utilizar la bibliografía de consulta y responder.**

- A.** 1- ¿Qué diferencias estructurales presentan las esporas respecto a las células vegetativas?  
2- ¿Qué componentes de las esporas son los responsables de su resistencia térmica? Justifique la respuesta.
- B.** ¿Es aconsejable lavar el material altamente contaminado antes del tratamiento con el agente esterilizante? ¿Por qué?
- C.** ¿En qué consiste la descontaminación? - Justifique la respuesta.
- D.** 1- ¿Por qué se requiere mayor tiempo de esterilización en estufa que en autoclave?  
2- ¿Cuál es el agente esterilizante en cada caso?
- E.** ¿Por qué es necesario ajustar el tiempo y la temperatura para lograr la esterilización?
- F.** ¿Para qué tipo de sustancias utilizará la filtración como método de esterilización?
- G.** ¿Qué consideraciones debe tener en cuenta previamente al cargar la estufa y el autoclave con material a esterilizar? Mencione al menos tres ejemplos de desinfectantes.
- H.** ¿Por qué normalmente los desinfectantes no pueden usarse sobre tejidos vivos?
- I.** ¿Qué medidas tomaría usted para verificar la efectividad de la esterilización en autoclave?

### Situaciones problemáticas

**1.** Usted utilizó el autoclave con el objetivo de esterilizar un medio de cultivo para un laboratorio de microbiología. En el proceso se olvidó de cerrar el escape de vapor (espita) una vez alcanzada la salida continua de vapor, al cabo de 10 minutos decidió apagar el autoclave:

- a) ¿Qué consecuencias acarreará este descuido?
- b) ¿Qué esperarías observar luego de incubar dicho medio de cultivo a 37 °C por 24 h si el mismo se encontraba contaminado solamente con células vegetativas?

**2.** El técnico en microbiología de un laboratorio de investigación cometió los siguientes errores. Explique por qué son errores y cuáles son las consecuencias de estos:

- a) Puso a esterilizar material y el autoclave no tenía agua en el interior.
- b) Puso a esterilizar medios de cultivos líquidos en un autoclave con las tapas de los frascos cerradas en forma hermética.
- c) Abrió la puerta del autoclave una vez terminados los 15 min a 121 °C, pero la temperatura aún estaba a 110 °C y la presión por encima de la presión atmosférica. ¿Cuál fue la situación si en el autoclave tenía soluciones? ¿Y si solo tenía cajas de tips (puntas de pipetas automáticas)?

d) Puso a esterilizar cajas de tips de plástico en un horno seco a 170 °C durante 3 horas.

3. De modo aséptico y por duplicado toma con hisopo un inóculo de una muestra de esporas de *Bacillus subtilis* y posteriormente lo introduce en un tubo de ensayo. A uno de los tubos lo rotula como “Tubo A” y al otro como “Tubo B”. A continuación, coloca al “Tubo A” en la estufa y al “Tubo B” en el autoclave, ambos durante 15 min a 121 °C, una vez culminado este tratamiento se adiciona 2 mL de medio de cultivo estéril a cada uno de los tubos y se los incuba en estufa a 37°C durante toda la noche. ¿Qué esperara ver al día siguiente en cada tubo? Justifique su respuesta:

### REFERENCIAS

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Vol. I. 7ª ed. Argentina: Farmacopea Argentina.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.

Organización Mundial de la Salud. (2009, Mayo). ¿Como lavarse las manos? Retrieved September 27, 2017.

Organización Panamericana de la Salud; “Manual de esterilización para centros de salud” Washington, D.C.: OPS, © 2008 pag.13.

Ministerio de Salud de la Nación. 2022. Manual de Procedimiento. Registro Nacional de Entidades de Evaluación Externa de la Calidad en Salud. Pag. 81-82. Disponible en [https://www.argentina.gob.ar/normativa/371287\\_disp226\\_pdf/archivo](https://www.argentina.gob.ar/normativa/371287_disp226_pdf/archivo)

Consultado:

14/03/2025

## TRABAJO PRÁCTICO N°2 MICROSCOPIA Y EXÁMEN EN FRESCO

### OBJETIVOS

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

### INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son organismos que no son visibles a simple vista y requieren el uso de instrumentos como **microscopios** para ser observados. Entre estos organismos de tamaño microscópico encontramos bacterias, virus, hongos y protozoos, entre otros. El microscopio óptico se ha transformado en uno de los medios más importantes para el diagnóstico de las infecciones.

### MICROSCOPIA

La microscopía es la ciencia de los usos y aplicaciones interpretativos de los microscopios. Los objetivos principales de la microscopía son:

- La formación de una imagen magnificada con la menor cantidad posible de defectos ópticos: se centra en producir representaciones visuales precisas y fieles de las estructuras observadas, minimizando distorsiones y anomalías en la imagen.
- El logro del contraste, que se basa en la observación diferencial de la luz entre la muestra estudiada y su medio: Este enfoque permite destacar detalles específicos y resaltar características importantes de la muestra, facilitando una visualización más clara y detallada.

Fundamentalmente existen dos clases de microscopio, según el principio en que se funda la amplificación de la imagen:

- 1. DE LUZ (ópticos):** Utilizan radiación en el espectro visible y un sistema de lentes ópticos.
- 2. ELECTRÓNICOS:** Emplean un haz de electrones en vez de ondas luminosas y un sistema de condensadores electromagnéticos. Entre ellos encontramos: **de transmisión** y **de barrido**, entre otros.

La escala representativa de los tipos de microscopio y sus tamaños relativos se esquematizan en la Figura 1.

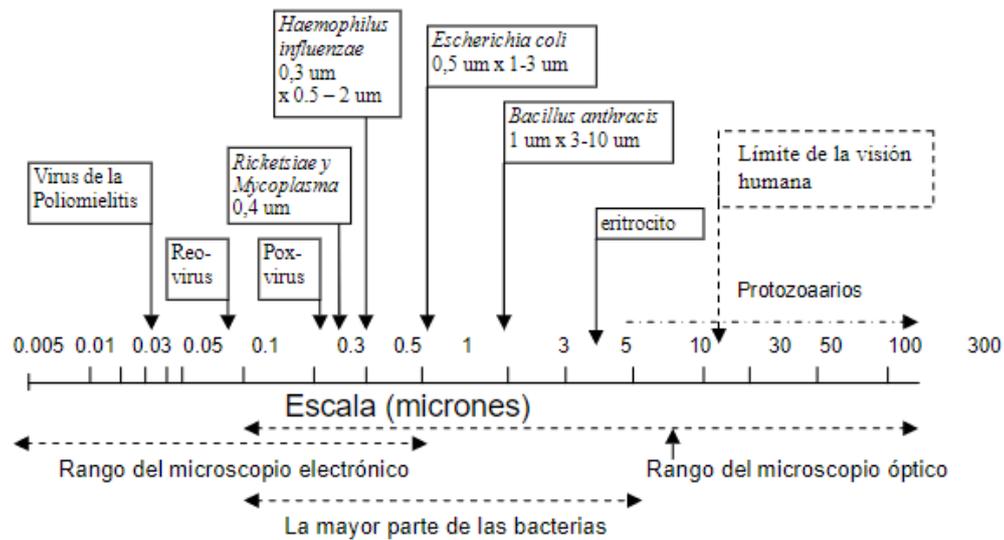


Figura 1: Escala representativa. Tamaños relativos.

## EL MICROSCOPIO ÓPTICO

Consiste en una combinación de lentes que logra imágenes aumentadas e invertidas. El material a estudiar debe ser convenientemente tratado para que reúna la transparencia, grosor y tamaño. El microscopio óptico aumenta el tamaño de la imagen de 40 a 1000 veces. Se utiliza para ver microorganismos cuyo tamaño varía desde 0,1 a 100 micrómetros ( $\mu$ ). El microscopio óptico consta de los siguientes sistemas (Figura 2):

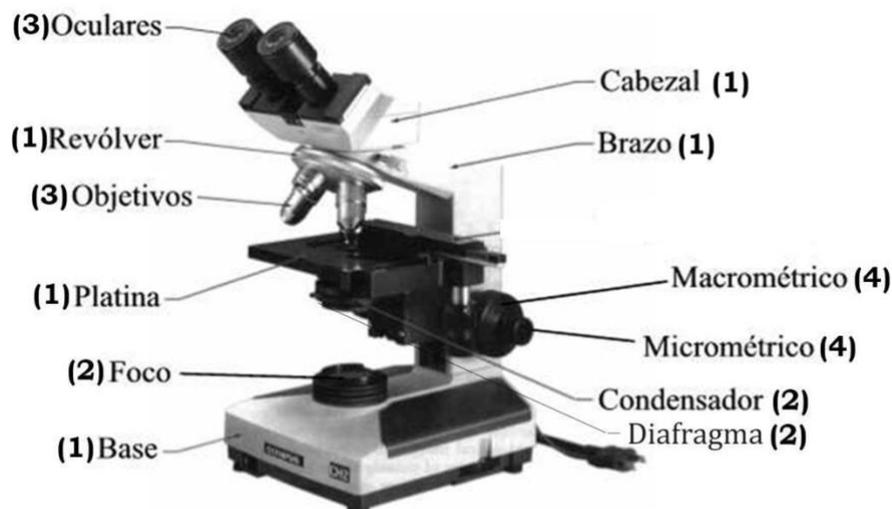


Figura 2: Microscopio Óptico: 1. Sistema de soporte o mecánico; 2. Sistema de iluminación; 3. Sistema óptico.

**1. Sistema de soporte o mecánico:** es el conjunto de elementos que tienen por objeto realizar las operaciones de sostén y movimiento del sistema óptico (Figura 2.1).

- **La base** es la parte sobre la que se asienta el microscopio.

- **El brazo** sostiene todo el conjunto de lentes al que se une por un sistema de cremallera (tornillos macro y micrométricos).
- **Macrométrico:** ejecuta movimientos mayores o groseros, permitiendo realizar ajustes rápidos en la posición de la platina para lograr un enfoque general de la muestra.
- **Micrométrico:** ejecuta movimientos finos o pequeños, permitiendo realizar ajustes precisos en la posición de la platina para lograr un enfoque detallado de la muestra.
- **El revólver** es una pieza giratoria en la que se enroscan los lentes objetivos.
- **El cabezal** es el dispositivo que sostiene los oculares, dentro del mismo se ubica el prisma que dirige la imagen a cada ocular.
- **La platina** es una plataforma horizontal con un orificio central donde se coloca la muestra, ajustada por el carro que es un dispositivo que permite mediante tornillos de mando, efectuar desplazamientos de atrás hacia adelante y de derecha a izquierda.

**2. Sistema de iluminación:** desempeña un papel crucial al proporcionar la luz necesaria para iluminar la muestra que está siendo observada (Figura 2.2).

- **Fuente de luz** puede utilizarse la luz natural o luz artificial eléctrica (foco).
- **El condensador** se emplea para concentrar los rayos de luz sobre la muestra. En la estructura del condensador está incluido el diafragma.
- **El diafragma** controla el diámetro del círculo de luz, asegura que la luz que sale del condensador llene exactamente el lente objetivo. Cuando se lo cierra, puede impedir el pasaje de los haces luminosos, con lo cual suelen a veces mejorar la visualización de algunos detalles microscópicos.

Generalmente los bajos aumentos requieren: condensador bajo y diafragma casi obturado y, cuando se observa con el objetivo de inmersión (100X) el condensador debe estar alto y el diafragma completamente abierto (Figura 3).

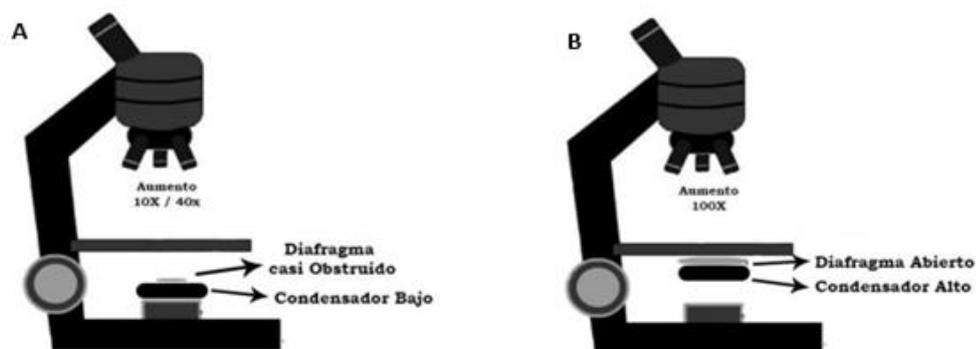


Figura 3: Condiciones para la correcta visualización al microscopio óptico: A) en 10X-40X, B) 100X

**3. Sistema óptico:** juega un papel fundamental en la formación de imágenes ampliadas y detalladas de la muestra (Figura 2.3). El microscopio óptico compuesto lleva esta denominación por estar formado por dos sistemas de lentes:

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

Los **OBJETIVOS**: Son los elementos más importantes y complejos del microscopio óptico. En el objetivo es donde se produce la mayor parte del aumento aportado por el microscopio. Su complejidad radica en el hecho de que para cumplir con su función necesita distintas lentes de alta calidad y precisión.

El aumento de un objetivo es la relación entre el tamaño de la imagen real y el tamaño del objeto observado en realidad. Estas dos magnitudes pueden observarse en la figura 4.

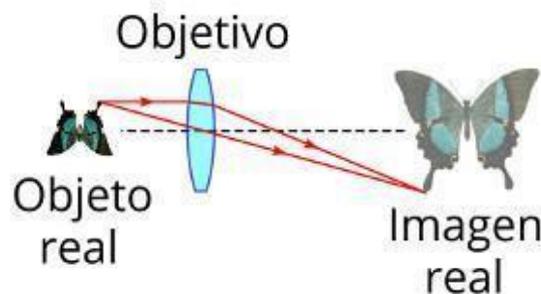


Figura 4: Representación del aumento de un objetivo

El aumento de un objetivo suele variar entre 4X a 100X, si bien es cierto que existen objetivos de alta calidad que pueden llegar a 250X.

El **aumento total** con el que se realiza una determinada observación, se obtiene al multiplicar el aumento del objetivo por el aumento aportado por el ocular.

Existen dos tipos básicos de objetivos

- **Objetivos Secos:** no hay ningún medio entre la muestra y el objetivo aparte del aire. Según su aumento se distinguen el **seco débil** (de poco aumento 5X, 10X), y el **seco fuerte** (40X).

- **Objetivos de Inmersión:** están diseñados para observar la muestra a través de una capa de medio de inmersión que normalmente consiste en aceite de índice de refracción superior al aire, por ejemplo, aceite de cedro (líquido viscoso que no se seca y es relativamente estable).

Esto significa que es necesario colocar la cantidad justa de aceite entre el cubreobjetos que protege la muestra y la lente del objetivo 100X.

La ventaja principal de utilizar objetivos de inmersión es que la luz que llega al objetivo no necesita atravesar el aire. Esto se traduce en un aumento en la calidad de imagen ya que reduce la refracción de la luz incidente. En consecuencia, los objetivos de inmersión son utilizados en aplicaciones donde se requiere un gran poder de aumento y alta resolución.

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

Existe además una variedad de microscopios especiales, cada uno diseñado para abordar necesidades específicas en la observación microscópica según la técnica utilizada y las características de la muestra.

## EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

El Microscopio Electrónico (Figura 5) utiliza un flujo de electrones en lugar de luz, lo cual le confiere la ventaja de su enorme amplificación, porque, a causa de la pequeñísima longitud de onda del haz de electrones que se utiliza para amplificar el objeto, puede aumentarse cien veces el poder de resolución del microscopio óptico.

En microscopía electrónica el material de observación debe ser sumamente fino y seco, ubicado sobre pequeñas pantallas que se introducen en el aparato en un punto situado

entre el condensador magnético y el objetivo magnético, que equivale a la platina del microscopio óptico.

La imagen amplificada se observa en una pantalla fluorescente a través de una mirilla de cierre hermético, o se impresiona en una placa fotográfica por una cámara adaptada al aparato. Ejemplo de imagen utilizando microscopía electrónica y microscopía óptica (Figura 6).



Figura 5: Microscopio electrónico

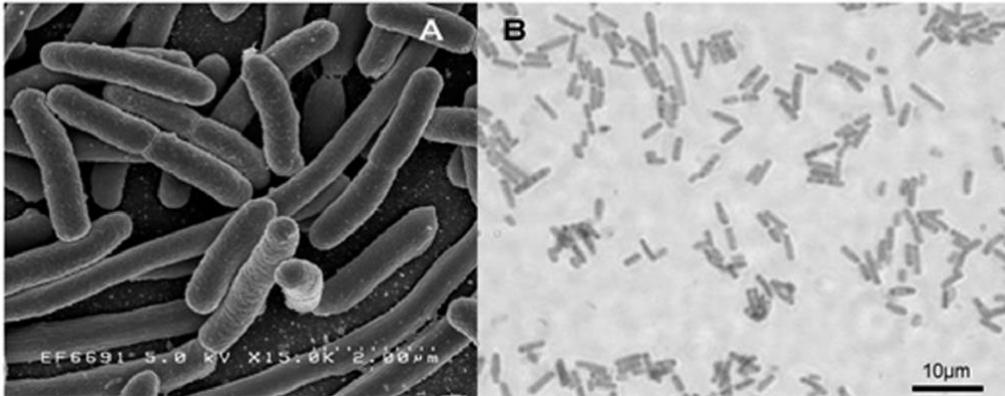


Figura 6: *E. coli*. A) Micrografía electrónica de barrido B) Microscopia óptica.

## 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 son:

- Color.
- Olor
- Aspecto
- Apariencia purulenta
- Presencia de gas
- Gránulos

Éstos pueden darnos pistas valiosas en cuanto a la naturaleza y calidad de las muestras recogidas. Por ejemplo, en microbiología clínica, la observación a simple vista de moco y sangre en heces, ayuda al médico a pensar en enfermedades infecciosas del intestino y su posible etiología bacteriana. 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, entre otros ejemplos.

## 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, o con el material **fijado y coloreado**.

Se realiza mediante el empleo de técnicas e instrumentos específicos. En la microbiología el examen microscópico generalmente es el primer paso que se da para la identificación de un organismo desconocido.

Existen distintas técnicas que nos permiten observar ciertos microorganismos:

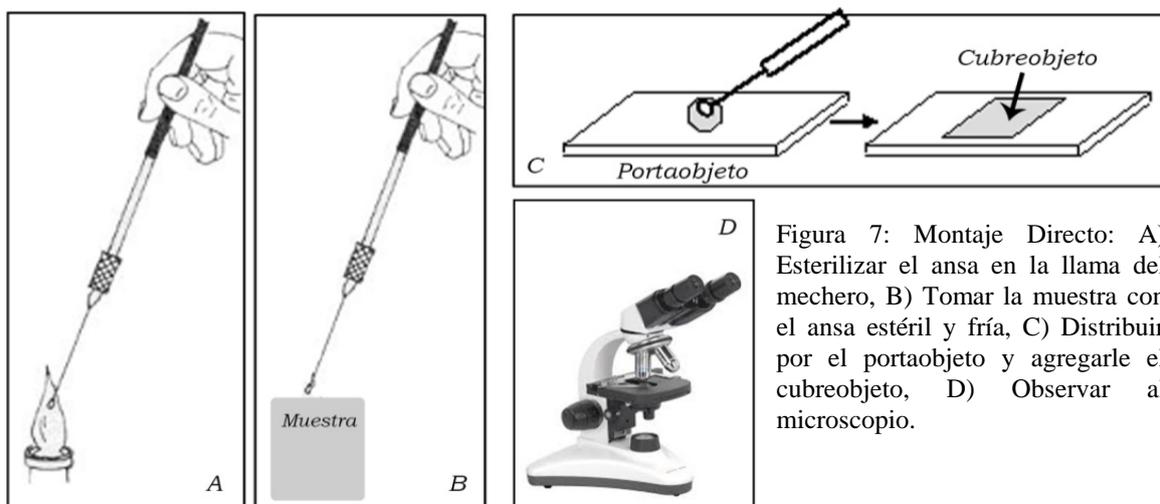
- **Examen microscópico en fresco**

Son técnicas utilizadas para observar muestras biológicas sin procesar, bajo un microscopio, sin la necesidad de fijadores ni tinciones. Este enfoque permite estudiar células y estructuras en su estado natural y proporciona información valiosa sobre la morfología, la movilidad y otras características dinámicas de las muestras.

La simple observación visual de una muestra para análisis microbiano, es la forma más rápida de apoyo al diagnóstico clínico. Entre ellas podemos encontrar:

- **Montaje Directo**

Si la muestra a observar es líquida, por ejemplo: Orina, solución fisiológica turbia, jarabes, etc. Se toma una pequeña alícuota de la muestra con el ansa ojal estéril o con pipetas adecuadas y se coloca entre porta y cubreobjetos (Figura 7). Para evitar la formación de burbujas, el cubreobjetos debe colocarse inclinado y una vez que el líquido se extienda en su borde, se deja caer lentamente. Se realiza la observación en microscopio óptico a 10X ó 40X.



- **Montaje en solución salina**

Se emplea para la observación de huevos, quistes, larvas, trofozoítos, movilidad de parásitos, entre otros (Figura 8).

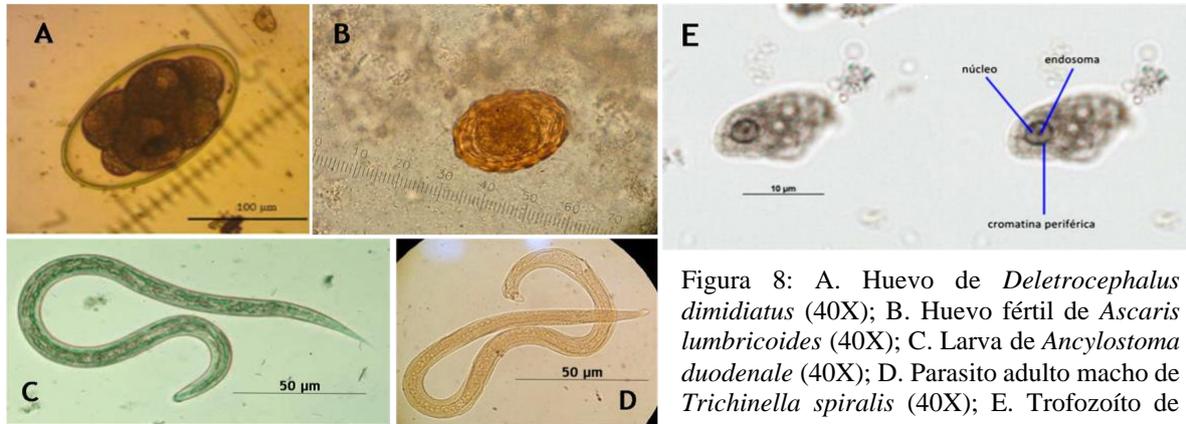


Figura 8: A. Huevo de *Deletrocephalus dimidiatus* (40X); B. Huevo fértil de *Ascaris lumbricoides* (40X); C. Larva de *Ancylostoma duodenale* (40X); D. Parasito adulto macho de *Trichinella spiralis* (40X); E. Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* (40X).

Sobre un portaobjetos, se deposita una gota de solución salina y una pequeña cantidad de muestra. Con un ansa, se realiza la extensión de la muestra en la gota de solución salina y se coloca un cubreobjetos. Para evitar desecación, puede rodearse con VasPar (mezcla de Vaselina y Parafina). Se realiza la observación con 10X ó 40X (Figura 9).

- **Técnica de la gota pendiente**

Se emplea para la observación de la movilidad de los microorganismos, como *E. coli*. Se realiza

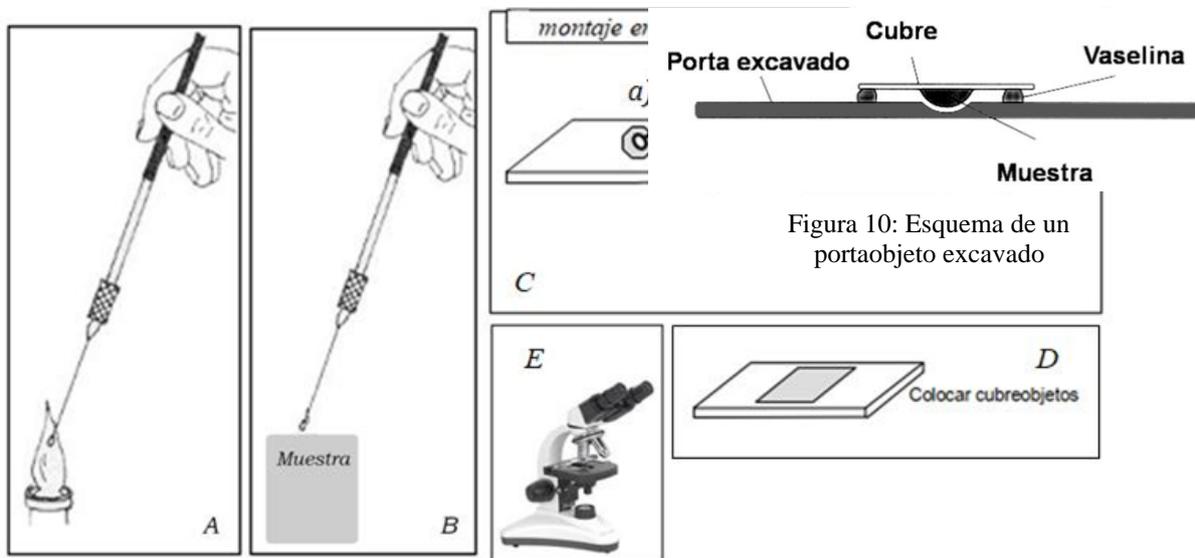


Figura 9: Montaje en solución salina: A) Esterilizar el ansa en la llama del mechero, B) Tomar la muestra con el ansa estéril y fría, C) a- Se suspende una gota de solución salina y una pequeña cantidad de muestra, b- Con un ansa, se realiza la extensión de la muestra en la gota del líquido, D) Se coloca el cubreobjeto, E) se observa al microscopio.

en portaobjetos excavados (Figura 10). Hay menor distorsión por el peso del cubre, primero se observa en 10X buscando el borde de la gota, una vez enfocado se pasa a 40X. Se utiliza condensador bajo para producir una iluminación moderada.

- **Montaje en Hidróxido de Potasio (KOH).**

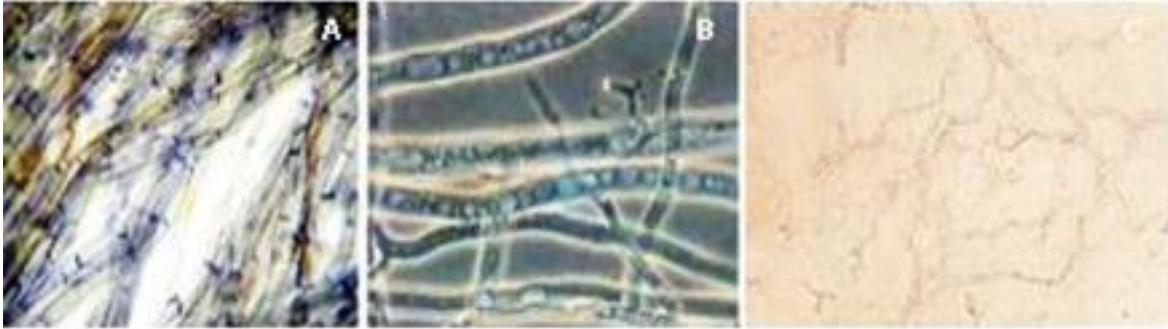


Figura 11: Montaje con KOH: A y B) Hifas de hongos pluricelulares extraídas de muestra de piel (40X), C) Escama de piel (40X).



Figura 12: Montaje KOH: A) Suspender en una gota de KOH al 10 %, B) Agregar la muestra escamas de piel, pelo o uñas, C) Colocar un cubreobjeto y dejar asentar a temperatura ambiente aproximadamente 30 min, D) Examinar al microscopio para detectar hifas/espores (40X).

Se emplea para la observación de células escamosas de piel, pelo, uña y elementos fúngicos en muestras que contienen queratina (Figura 11). Se emplea una solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 10 %, que disuelve la queratina de fondo desenmascarando los elementos fúngicos hasta hacerlos más visibles. Se puede agregar azul de lactofenol al KOH para facilitar la visualización de los hongos (Figura 12).

- **Montaje en Iodo**

Esta técnica se utiliza para observar materia fecal, donde se encuentran protozoos, huevos y larvas de helmintos (parásitos del ser humano), (Figura 13). Se utiliza solución de Lugol (Yoduro de potasio – Yodo), el cual tiñe núcleos y organelas citoplasmáticas (Figura 14).



Figura 14: Montaje en Iodo: A) Suspender sobre un portaobjeto en una gota de solución de iodo, B) Colocar una pequeña cantidad de materia fecal; C) Colocar un cubreobjeto, D) Examinar al microscopio en 10x y 40x.

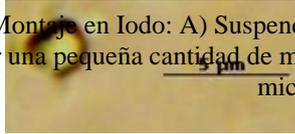


Figura 13: Quiste de *Endolimax nana* teñido con lugol, con 4 núcleos. Muestra extraída de materia fecal (40X).

### • Técnica la Tinta China

Se emplea para la observación de microorganismos que no se tiñen fácilmente, como espiroquetas o microorganismos con cápsulas que no retienen los colorantes. La tinta china permite un fondo semi-opaco contra el cual se observan las cápsulas incoloras o claras y brillantes. Esta técnica puede ser útil para estudiar la morfología y el tamaño. No proporciona detalles internos de la estructura celular, ya que los microorganismos no se tiñen directamente (Figura 15)

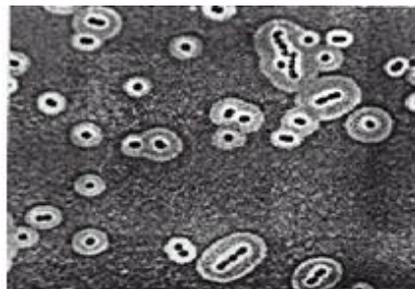


Figura 15: Tinción con tinta china: cápsulas incoloras que rodean a las bacterias.

- **Técnica de la cinta adhesiva**

Se emplea para observar estructuras fúngicas como conidios/espores, micelio, fiálides, entre otras (Figura 16). La técnica consiste en colocar sobre un portaobjeto una gota de Azul de lactofenol; cortar un fragmento de cinta adhesiva de aproximadamente 6 cm, y apoyar sobre una colonia desarrollada en la placa de Petri. Las estructuras fúngicas se “pegan” a la cinta la cual, luego, se adhiere al portaobjeto. Observar inmediatamente al microscopio en 10X y 40X. Transcurridos 15 minutos la cinta adhesiva se torna opaca y dificulta la visualización de los elementos fúngicos (Figura 17).

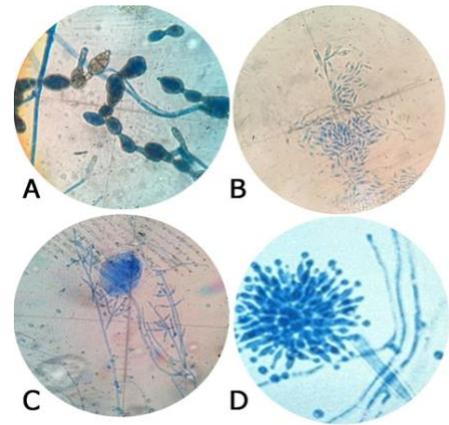


Figura 16: Estructuras fúngicas: A) *Alternaria* sp. (40X), B) *Fusarium* sp. (10X), C) *Trichoderma* sp. (10X), D) *Aspergillum* sp. (40X).



Figura 17: Técnica de la cinta adhesiva.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la realización de un examen macro y microscópico de las muestras asignadas.

### ACTIVIDAD N°1: EXAMEN MACROSCÓPICO

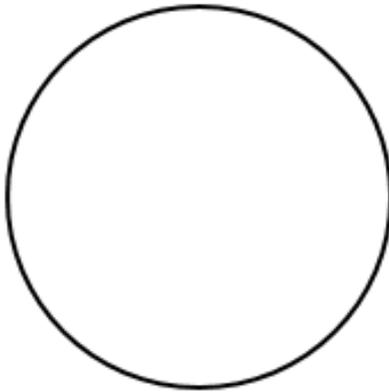
Observar y anotar las características macroscópicas de las muestras biológicas asignadas.

### ACTIVIDAD N°2: TECNICAS PARA EXAMEN EN FRESCO

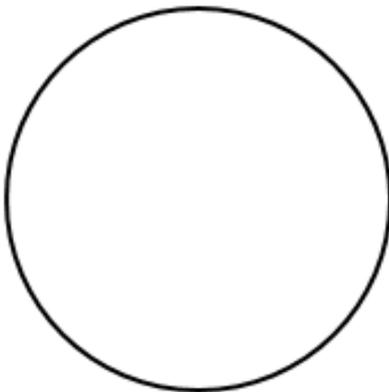
Realizar a las muestras biológicas asignadas, las técnicas correspondientes.

### ACTIVIDAD N°3: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

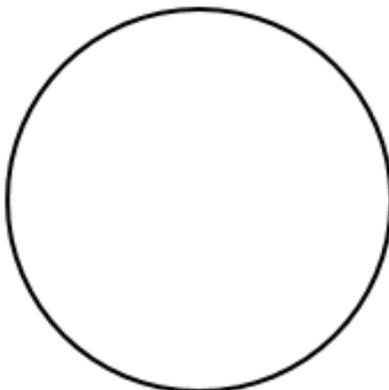
Observar al microscopio óptico y esquematizar.



Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....



Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....

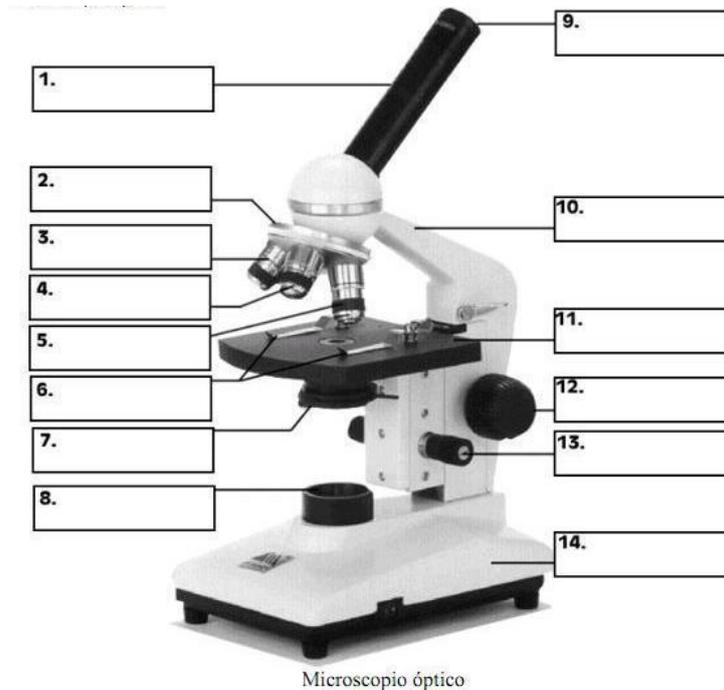


Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....

## CUESTIONARIO GUÍA

Utilizar la bibliografía de consulta y responder.

A. Identificar las partes de un microscopio óptico:



B. ¿Cuáles son las precauciones y cuidados que debe tener con el uso del microscopio óptico?

C. ¿Qué estructuras celulares se pueden observar utilizando los objetivos secos y de inmersión del microscopio óptico?

D. El examen en fresco:

1- ¿Para qué tipo de muestras biológicas se utiliza?

2- ¿En qué radica la importancia de la misma?

3- ¿Qué criterio utiliza para la elección del colorante?

E. Observe el material audiovisual “**Técnica de la cinta adhesiva**” disponible en el aula virtual y responda:

1- ¿Para qué tipo de muestras biológicas se utiliza?

2- ¿En qué condiciones de esterilidad se realiza el preparado?

3- ¿Qué estructuras celulares se observan con los diferentes aumentos?

### **REFERENCIAS**

- Arraiza, N., Viguria, PM., Navarro, J. y Ainciburu, A. (2008). Manual de Microscopia. Historia, Descripción y Uso del Microscopio Óptico. Auxilab, SL, 3.
- Madigan, MT.; Martinko, JN.; Parker, J. y Pearson. B. (2013). Biología de los microorganismos. 10° Ed. Madrid. Ed. Pearson - Prentice-Hall.
- Prescott, LM, Harley, JP. y Klein, DA. (2004). Microbiología. 5° Ed. Madrid. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

## TRABAJO PRÁCTICO N°3

### TINCIÓN DE MICROORGANISMOS

#### OBJETIVOS

- Conocer diferentes metodologías de tinción para la visualización de estructuras microbianas.
- Adquirir entrenamiento en los diversos procedimientos para la tinción.
- Realizar la observación microscópica de los distintos tipos celulares.
- Discutir la importancia del empleo de tinciones apropiadas en el estudio morfológico del tamaño, forma y agrupación de las células y en la identidad de microorganismos.
- Comprender la utilidad de la tinción de Gram y Zielh Neelsen en el análisis sistemático de muestras clínicas.

#### INTRODUCCIÓN

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

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

Cuando se trata de realizar coloraciones a partir de cultivos microbianos, se utilizan cultivos jóvenes ya que en los cultivos envejecidos las células pierden su afinidad para la mayoría de los colorantes.

Las tinciones más usadas en microbiología, aunque no las únicas son: Gram, Ziehl-Neelsen, Wrigth-Giemsa, azul de metileno, fluorocrómicas, entre otras.

A los colorantes se los clasifica como básicos o ácidos.

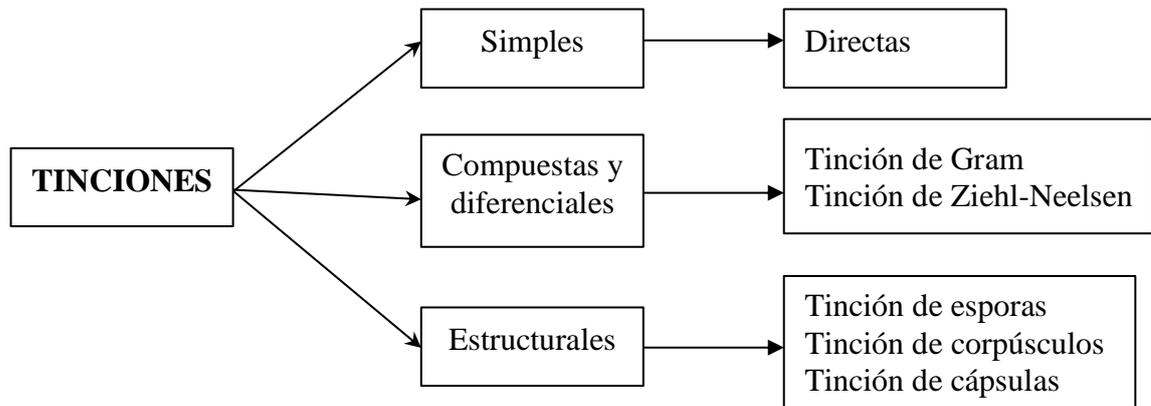
#### **Colorante Básico:**

Muchos de los colorantes comúnmente usados están cargados positivamente (catiónicos) y se combinan fuertemente con los constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos: azul de metileno, cristal violeta y safranina.

- **Colorante Ácido:**

Estos están cargados negativamente (aniónicos) y se combinan con constituyentes celulares cargados positivamente, como numerosas proteínas. Ejemplos: eosina, fucsina ácida.

Las tinciones pueden ser: simples, compuestas o diferenciales y/o estructurales.



- **Tinción simple**

Aquella en la que sólo se utiliza un colorante, que generalmente tiñe a los microorganismos. Esta permite apreciar en forma rápida la morfología, tamaño y agrupación de los mismos, además de células epiteliales, leucocitos, etc. Este tipo de tinción se denomina **directa**. Los colorantes generalmente utilizados son: Azul de Metileno, fucsina y el cristal violeta.

Si el colorante proporciona una coloración al fondo, sin alterar el aspecto de las células, que permanecen sin teñir, la tinción se denomina **negativa** y permite conocer el tamaño y la morfología de los microorganismos. Existen dos tipos de tinciones negativas: la tinción con tinta china y la tinción con Nigrosina.

- **Tinción diferencial**

Cuando se emplea más de un colorante para teñir una muestra el procedimiento recibe el nombre de tinción **compuesta** y debido a que no tiñen de la misma manera a todos los tipos celulares se denominan **diferenciales**. Los colorantes que se utilizan reaccionan de modo diferente con los distintos microorganismos, generalmente debido a diferencias en la estructura y/o composición química de la pared celular. La más utilizada es la tinción de **Gram**, que permite dividir a los gérmenes en dos grandes grupos: Gram Positivos y Gram Negativos, basados en la composición química de la pared celular que permite o no, tomen la coloración del colorante básico: Cristal Violeta o Violeta de Genciana.

La tinción de **Ziehl Neelsen** colorea los bacilos ácido-alcohol resistentes, agente etiológico de la Tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y la Lepra (*Mycobacterium leprae*).

- **Tinción estructural**

Se utiliza para identificar y estudiar determinadas estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos. En las tinciones estructurales se colorea únicamente una parte de la célula. Se utilizan este tipo de tinciones para poner en evidencia la presencia de cápsulas, endosporas, flagelos o inclusiones (almidón, polifosfato, etc.).

### PROCEDIMIENTO GENERAL DE TINCIÓN

En todas las tinciones se llevan a cabo los pasos que se describen. Figura 1.

1. Extendido
2. Fijación
3. Coloración
4. Lavado
5. Secado
6. Observación microscópica.

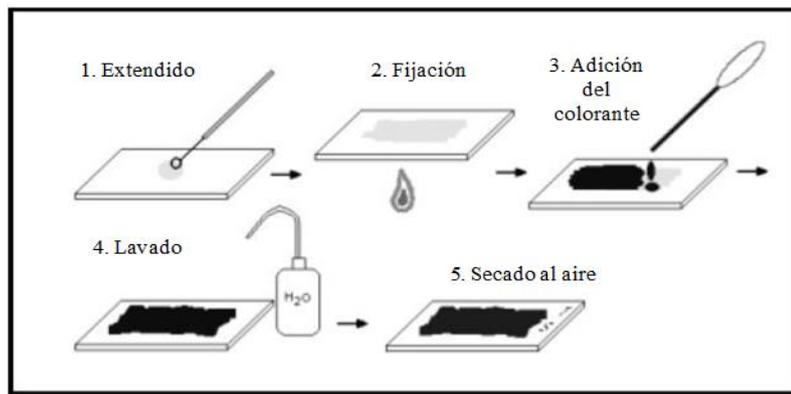


Figura 1: Procedimiento general para realizar una tinción

#### 1. Extendido de la muestra

Para realizar un extendido se toma una pequeña gota de una de la muestra líquida o cultivo bacteriano con el ansa de siembra esterilizada, y se extiende sobre un portaobjetos limpio (Figura 2).

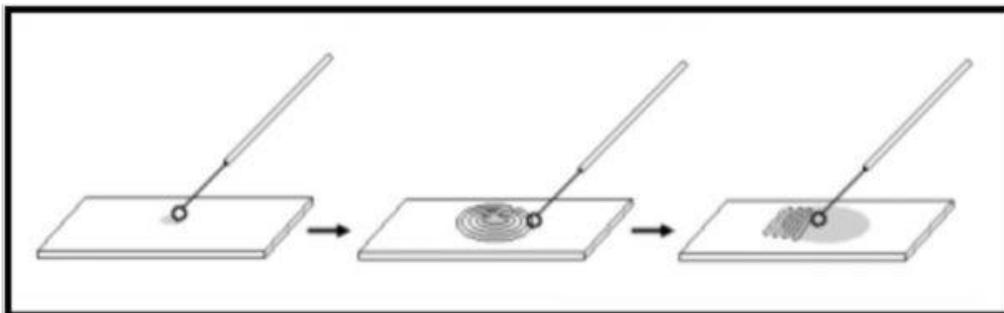


Figura 2: Procedimiento de extensión de una muestra líquida

Si el cultivo procede de un medio sólido, se coloca previamente una gota de agua en el portaobjetos y se mezcla con una pequeña cantidad de la muestra hasta formar una suspensión homogénea, extendiéndose con el fin de obtener una fina película (Figura 3). Posteriormente, se deja secar al aire o en la parte alta de la llama del mechero, pero no se debe eliminar el líquido calentando el portaobjetos a la llama directa porque pueden distorsionarse las células.

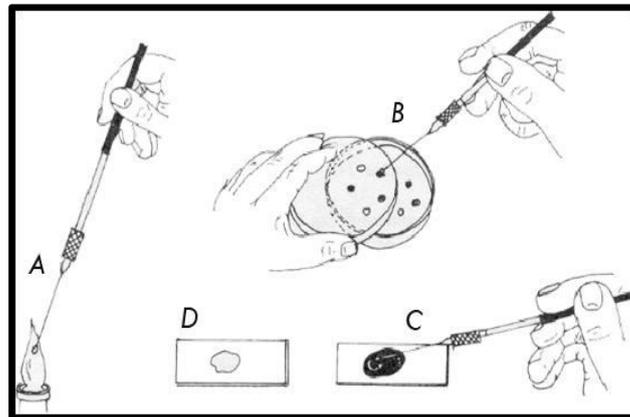


Figura 3: Procedimiento de extensión de una unidad formadora de colonia.  
A) Esterilizar el ansa; B) Tomar la UFC; C) Extender sobre un portaobjetos; D) Dejar secar.

## Fijación

La fijación tiene como finalidad coagular el protoplasma de las células y lograr que se adhieran al portaobjetos, siendo **el calor** el método más utilizado para este fin, aunque pueden utilizarse otros agentes, como el alcohol (metanol) u otros compuestos químicos.

Se recomienda la fijación por calor, cuando se trabaja con muestras de un cultivo sólido. En muestras obtenidas de un cultivo líquido es mejor hacer la fijación con metanol ya que se retienen en el portaobjetos un mayor número de células. Es necesario que el extendido se haya secado antes de proceder a la fijación, por ello se debe esperar hasta que el líquido de la misma se evapore.

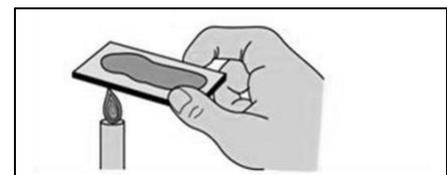


Figura 4: Fijación, flamear a la llama del mechero.

El proceso de fijación por calor se lleva a cabo pasando varias veces la preparación seca a través de la llama de un mechero, con el extendido hacia arriba (Figura 4). El calor desnaturaliza las proteínas causando la muerte. Es importante no excederse en este proceso, para evitar que las bacterias se deformen o se rompan, para ello es suficiente que el portaobjetos se sienta tibio sobre el dorso de la mano.

## 2. Coloración

Cubrir el extendido con abundante colorante y dejarlo actuar durante el tiempo estipulado (Figura 5).

En ocasiones es necesario decolorar, esto aumenta la permeabilidad de la pared y el colorante es eliminado con mayor facilidad.

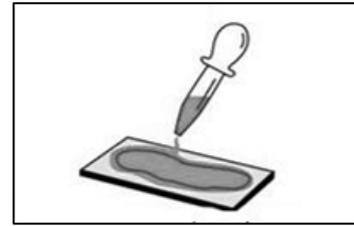


Figura 5: Tinción de la muestra

## 3. Lavado

Luego de transcurrido el tiempo de cada colorante o decolorante, se lavan con agua las preparaciones teñidas, dejando caer con suavidad el agua sobre un extremo del portaobjetos, que se mantendrá inclinado durante este proceso. No se debe dirigir el agua con demasiada fuerza sobre la preparación para no arrastrar la muestra.

## 4. Secado

Para eliminar el exceso de agua del portaobjetos se deja secar al aire por unos minutos. Se puede utilizar un papel secante sin frotar.

Otra técnica permite acercar el preparado teñido a unos 20 cm por encima de la llama del mechero, evitando el sobrecalentamiento de la muestra teñida que podría crear artificios indeseados.

## 5. Observación microscópica

Se realiza con el objetivo de inmersión (100X), colocando previamente una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.

## TINCION DE GRAM

Se usan dos colorantes, **Cristal Violeta** (colorante primario) y **Safranina** (colorante secundario o de contraste).

Se realiza en cuatro etapas (Figura 6):

- 1- La muestra debe estar previamente fijada.
- 2- Se aplica el **colorante primario** (Cristal Violeta), como resultado, todas las bacterias se tiñen de lila. Se deja colorear durante 30 segundos y se enjuaga con agua.
- 3- Se agrega el **mordiente** (Lugol) se deja actuar durante 60 segundos, a continuación, se enjuaga con agua. En este paso se forma el complejo Cristal Violeta-Iodo en el interior de las

bacterias.

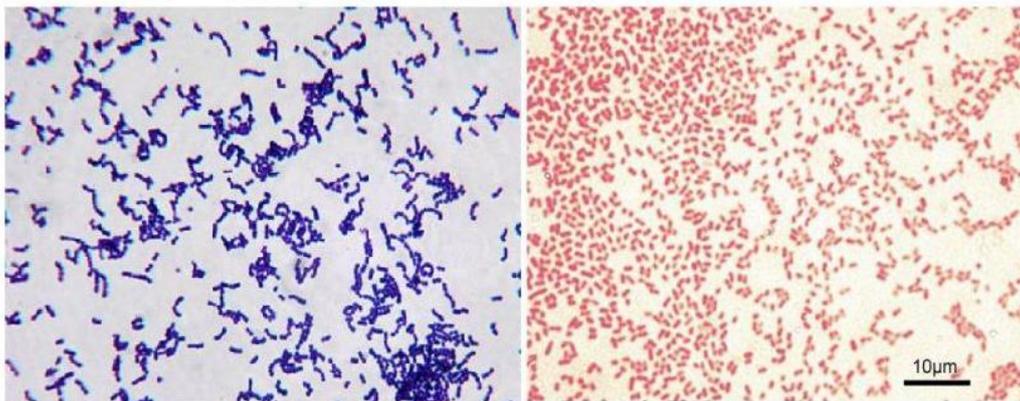
4- Se **decolora** la muestra (paso crítico) donde las células Gram (+), retienen al complejo Cristal Violeta-Iodo y las Gram (-), se decoloran completamente. Para ello se realiza un lavado con alcohol acetona, permitiendo que este y el preparado permanezcan en contacto unos pocos segundos, luego enjuagar con abundante agua.

5- Se aplica el **colorante de contraste** (Safranina) las células Gram (-) que fueron decoloradas en el paso anterior, ahora se tiñen de color rosado. Este paso dura 30 segundos, luego se enjuaga con agua nuevamente.

6- Una vez que el preparado se haya secado, se observa al microscopio (Figura 7).



Figura 6: Tinción de Gram



Bacterias Gram positivas

Bacterias Gram negativas

Figura 7: Observación al microscopio óptico de bacterias Gram (+) y Gram (-).

La tinción diferencial de **Gram** se fundamenta tanto la composición química y la permeabilidad de la pared celular de las bacterias, como en las distintas solubilidades de los complejos y los compuestos formados (Figura 8).

El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram (+) es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano con ácido teicoico. Su presencia favorece la fijación del complejo Cristal Violeta- Iodo, dado que el decolorante (alcohol acetona), atraviesa con dificultad la gruesa pared celular, debido a la deshidratación que produce y a la reducción de los poros de la misma.

La pared celular de las Gram (-), contiene una capa delgada de peptidoglicano y está rodeada por una membrana externa compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas. Es

probable que, por el mayor contenido de lípidos de estas paredes celulares, al incorporar alcohol o acetona (en el paso de la decoloración), aumenten la permeabilidad de la pared y el complejo Cristal Violeta- Iodo sea eliminado.

Este fundamento se refuerza al observar que los microorganismos Gram (+) que han perdido la integridad de su pared celular, ya sea, debido a un tratamiento con antibióticos, al envejecimiento o a la acción de enzimas autolíticas, permiten el escape del complejo Cristal Violeta- Iodo en la etapa de decoloración.

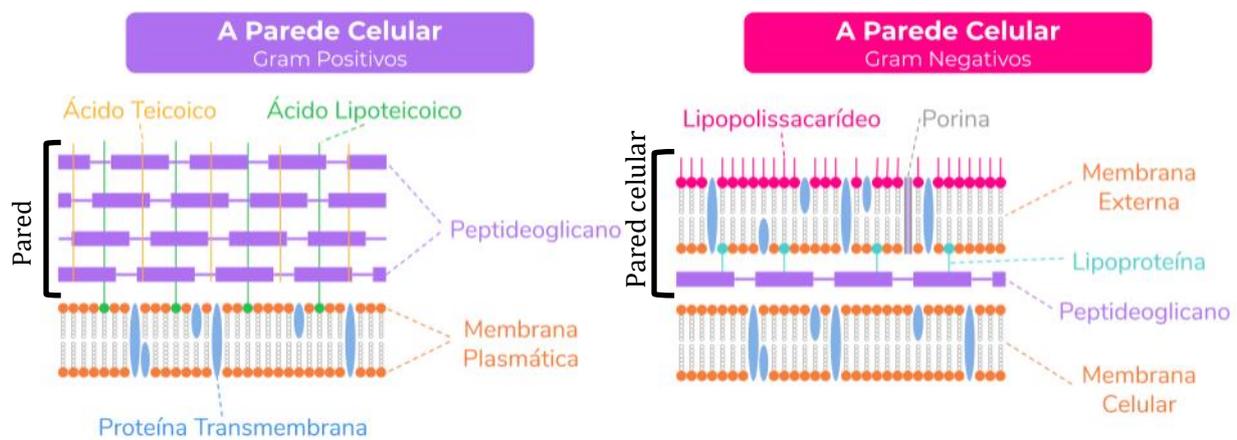


Figura 8: Estructura de la pared de bacterias Gram (+) y Gram (-).

### Posibles errores de la tinción Gram

- Fijar el frotis a la llama cuando el preparado está húmedo todavía
- Extendidos muy gruesos
- Precipitación de la solución del Cristal Violeta (hay que filtrar o preparar una nueva)
- El Lugol no actuó el tiempo suficiente o estaba muy diluido
- El lavado insuficiente con agua en cualquiera de las etapas
- La decoloración con alcohol acetona:

En exceso: se ven todas las bacterias como Gram (-)

Escaso: se ven todas las bacterias como Gram (+)

- Una coloración en exceso con la fucsina o safranina

### TINCIÓN ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE DE ZIEHL NEELSEN

Otra técnica de tinción diferencial que depende de la composición química de la pared bacteriana es la tinción ácido alcohol resistente (BAAR). Se emplea para la tinción de bacilos tuberculosos, micobacterias y algunos parásitos. Son bacterias Gram positivas que resisten la decoloración con decolorantes enérgicos como el alcohol ácido (EtOH al 95 % y HCl al 3 %),

esto se debe a la presencia de ácidos grasos en sus paredes celulares (Figura 9) que las hace impermeables a la mayoría de los colorantes como así también a los decolorantes.

Las micobacterias presentan entre un 20 y un 40 % de su peso seco, lípidos y su pared concentra el 60 % de ellos. Esto explicaría las propiedades de las micobacterias como impermeabilidad a los colorantes, ácido resistencia, resistencia a la acción letal de ácidos y álcalis, o a la acción bactericida de anticuerpos. Entre los lípidos que se extraen con solventes orgánicos están las ceras y los glucolípidos y el más importante de los ácidos grasos en las micobacterias es el ácido micólico, ya que solo se encuentra en estos microorganismos.

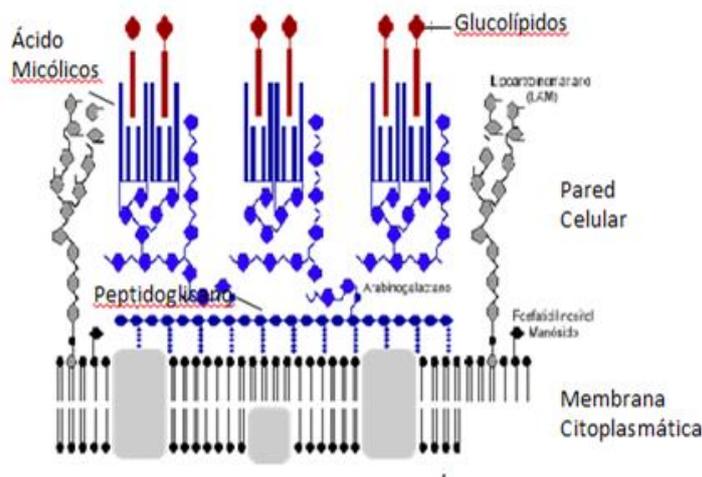


Figura 9: Estructura de la pared celular de bacterias  
Ácido Alcohol Resistente

Para esta tinción se utiliza como colorante primario la **carbolfucsina o fucsina fenicada**, que penetra a través de la pared celular cerosa de los bacilos ácido-alcohol resistentes, mediante un tratamiento físico enérgico, que puede ser:

**Calor:** en la técnica convencional de Ziehl Neelsen, luego de cubrir el extendido con carbolfucsina se acerca el preparado unos cm por encima de la llama del mechero, hasta observar desprendimiento de vapores blancos de la solución colorante.

**Agente tensioactivo:** Se añade al colorante un agente tensioactivo como el tergitol. Esta técnica en frío es la modificación de Kinyou. El colorante triaminotriifenilmetano (carbolfucsina), se combina con el ácido micólico de la pared celular micobacteriana.

La tinción se realiza en 4 pasos (Figura 10):

1- Luego de la **fijación** por calor del extendido, se agrega el **colorante primario** (carbolfucsina) hasta cubrirlo por completo.

2- En un periodo de 5 minutos, se pasa una llama por debajo del extendido hasta observar desprendimientos de vapores blancos de la solución colorante, repetir el procedimiento 3 veces. Este paso facilita el ingreso del colorante a las células.

3- Se **decolora** completamente con alcohol ácido hasta que no aparezca color en el líquido de lavado. Se enjuaga con agua.

4- Se aplica el **colorante de contraste** (azul de metileno) por unos minutos. Se enjuaga con agua y se deja secar al aire.

5- Se observa con el objetivo de inmersión (100X) colocando previamente una gota de aceite de inmersión sobre la preparación. (Figura 11).



Figura 10: Tinción de Ziehl Neelsen

Los bacilos acidorresistentes se teñirán de rojo/rosado. El fondo, los elementos celulares, y las bacterias que no son ácido alcohol resistentes tomarán el color del colorante de contraste (azul).

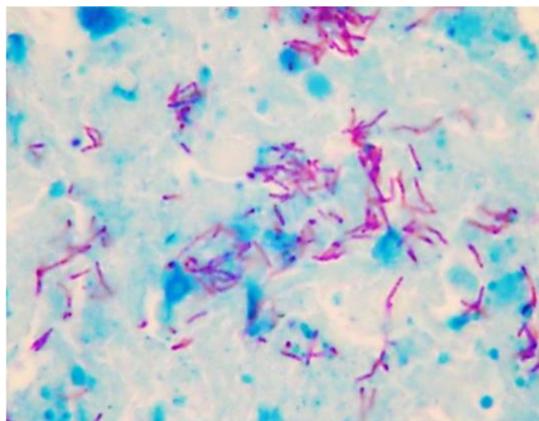


Figura 11: Tinción de Ziehl Neelsen:  
Observación de bacterias  
ácido alcohol resistentes

### Mordientes y decolorantes

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

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

Una vez que el microorganismo ha sido teñido intensamente y el colorante se ha fijado por

acción del mordiente, no es fácil eliminarlo. Sin embargo, las bacterias varían en su comportamiento respecto a esto, lo que hace posible las coloraciones diferenciales.

El colorante se elimina de ciertas bacterias mediante decolorantes, tales como alcoholes diluidos, acetona, éter, ácidos orgánicos, entre otros, lo que hace que sea necesario la aplicación de un colorante de contraste.

### TINCIÓN DE ENDOSPORAS CON LA TÉCNICA SCHAEFFER – FULTON

Ciertas especies bacterianas, en particular los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, producen elementos de resistencia denominados endosporas, debido a que se forman dentro de la célula. A diferencia de la célula procariota que la produce, la espora es muy resistente a condiciones adversas tales como alta temperatura, baja humedad, radiaciones y agentes químicos. Es una forma de vida latente que puede permanecer largos períodos de tiempo como tal y cuando desaparecen las condiciones adversas puede germinar.

La cubierta de la endospora es más compleja e impermeable que la pared celular de la célula vegetativa donde se forma, para poder teñirla, hay que alterarla utilizando calor. Una vez que se logra teñir las endosporas, es difícil decolorarlas.

El verde de malaquita es un colorante débilmente básico (tiene una carga positiva débil) y por lo tanto, se une débilmente a la bacteria, penetrando en las células vegetativas. Cuando estas se someten al calor, el colorante ingresa en las endosporas. Durante el lavado con agua, el verde de malaquita sale de las células vegetativas, pero no de las endosporas. El colorante de contraste: fucsina, solo puede teñir las células vegetativas (Figura 12).

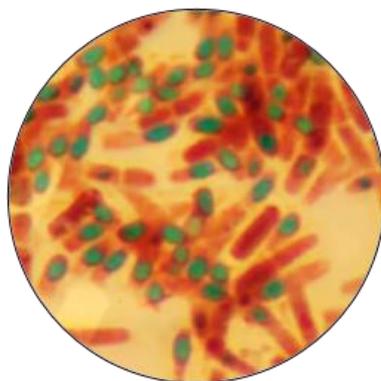


Figura 12. Técnica Shaeffer Fulton.  
*Bacillus thuringiensis*: células vegetativas (rosa)  
y endosporas (verde)

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

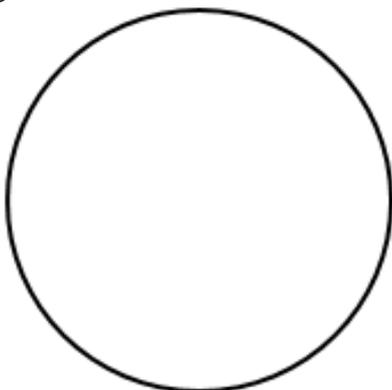
Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la realización y observación de preparados con diferentes técnicas de tinción.

### ACTIVIDAD N°1: TINCIÓN DE GRAM

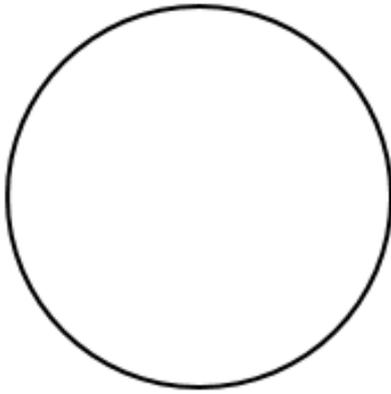
Realizar la técnica de tinción de Gram a diferentes cultivos bacterianos

#### Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos limpio y desengrasado e identificarlo utilizando un marcador indeleble.
2. Proceder según la muestra sea líquida o sólida.
3. Colocar sobre el portaobjetos una gota de muestra o solución fisiológica.
4. Abrir la placa o tubo junto al mechero y con el ansa de ojal, previamente esterilizada a la llama y enfriada, tocar una colonia y cerrar inmediatamente la placa o tubo y suspender por rotación el material cargado en el ansa sobre la gota de agua o solución fisiológica preparada en el paso 2.
5. Dejar secar cerca del mechero. Se evidencia cuando se torna completamente opaco.
6. Pasar tres veces por la llama del mechero para la fijación de la muestra.
7. Cubrir el preparado con Cristal violeta. Dejar actuar **30 segundos**. Lavar con abundante agua.
8. Cubrir el extendido con Lugol. Dejar actuar **1 minuto**. Lavar con abundante agua.
9. Cubrir el extendido con el decolorante alcohol acetona, a los **5 segundos** inclinar el preparado y lavar con abundante agua.
10. Cubrir con Safranina, dejar actuar durante **1 minuto**. Lavar con abundante agua.
11. Dejar secar cerca del mechero.
12. Observar al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X). Esquematizar y completar el protocolo de observación. Registrar: morfología, agrupación y coloración de microorganismos.



Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....

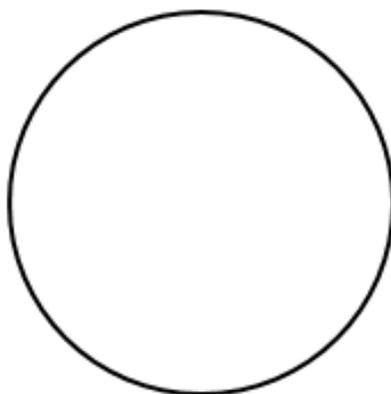


Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....

## ACTIVIDAD N°2: TINCIÓN ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE DE ZIEHL NEELSEN

Realizar los pasos 1 a 6 de la técnica de Tinción de GRAM.

1. Agregar **fucsina fenicada** cubriendo todo el preparado.
2. Con un hisopo embebido en alcohol, encender y pasar por debajo del portaobjetos, hasta observar el desprendimiento de vapores blancos, evitando la ebullición del colorante. Dejar enfriar **1 minuto**, repetir hasta completar **5 minutos**.
3. Lavar con el decolorante alcohol-ácido hasta obtener una coloración rosada muy tenue. Lavar con abundante agua.
4. Cubrir con el colorante de contraste azul de metileno, durante **1 minuto**.
5. Enjuagar con abundante agua. Dejar secar al aire.
6. Observar al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X). Esquematizar y completar el protocolo de observación. Registrar: morfología y coloración de las bacterias.



Muestra: .....  
Observación: .....  
Coloración: .....  
Aumento: .....

## CUESTIONARIO GUÍA

Utilizar la bibliografía de consulta y responder:

**A. Tinción de endosporas con la técnica Schaeffer – Fulton.**

Mire con atención el video del procedimiento para la tinción de endosporas disponible en <https://mediacampus.cuaieed.unam.mx/node/4246> , o escaneando el QR:



- Escriba paso a paso el procedimiento.
- ¿Qué son las endosporas?
- ¿A qué se debe que estas estructuras se tiñan de manera diferencial?
- ¿Cuáles son los colorantes utilizados? ¿Por qué?
- ¿Qué importancia tiene en la clínica esta técnica?

**B. Tinción de bacterias ácido- alcohol resistentes.**

Mire con atención el siguiente video disponible en [https://youtu.be/vYUr7c\\_BDZY?si=wNg4GXjytSd6HOlg](https://youtu.be/vYUr7c_BDZY?si=wNg4GXjytSd6HOlg) o escaneando el QR y luego responda:



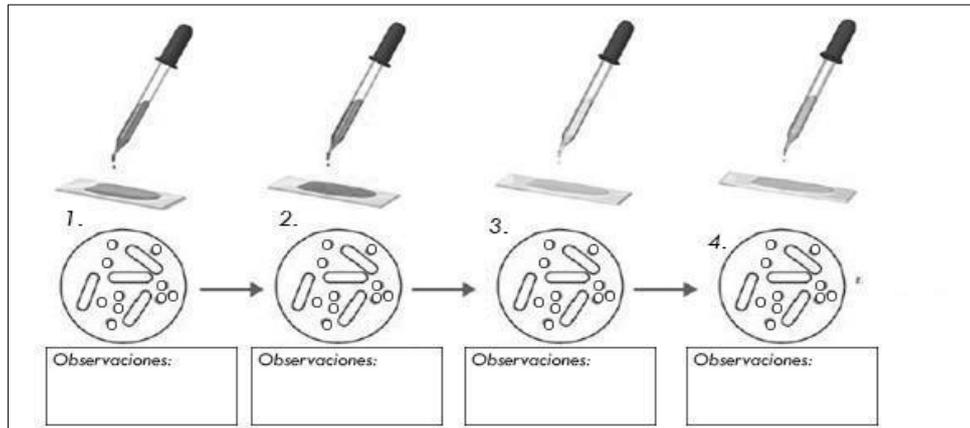
- ¿Cuál es el fundamento de la técnica de ácido-alcohol resistente de Ziehl Neelsen? ¿con qué finalidad se realiza esta técnica en la clínica?
- Complete la siguiente tabla:

Paso de la Tinción	Producto que se emplea	Reacción y coloración de las bacterias	
		Bacterias ácido alcohol resistentes	Otras bacterias
Colorante Básico (5´)			
Mordiente			
Decoloración (hasta que se elimine el exceso de colorante)			
Contraste (1´)			

**Tinción de Gram**

- ¿Cuál es el fundamento y finalidad de la tinción de Gram?

**B.** Complete el siguiente esquema, considerando los pasos consecutivos de la tinción Gram, los bacilos serán Gram (-) y los cocos Gram (+). Pinte las bacterias según la coloración que tenga en cada paso. En el cuadro de observaciones indique de qué paso se trata, qué reactivos utilizó y cuánto tiempo requirió cada uno.



**C.** ¿Justifique la dificultad que presentan las endosporas para colorear con esta técnica?

**D.** ¿Cuál será el resultado de una prolongada decoloración en cualquier procedimiento de coloración?

**E.** ¿Cuál será el resultado si Ud. olvida utilizar el colorante de contraste en la técnica de Gram?

### SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

Ud. realiza coloraciones de Gram a partir de cultivos frescos de *E. coli* y de *Staphylococcus aureus*, indique qué esperaría observar al microscopio si:

- Los pasos de extendido, fijación y coloración se realizan correctamente.
- Si por error agrega primero el colorante de contraste y por último el cristal violeta.  
¿Podría distinguir una cepa de la otra? Si...:
- Si por error efectúa la decoloración con etanol al 70% por 30 segundos.
- Si efectúa la decoloración con etanol al 50% durante 30 segundos.
- ¿Qué pasaría si no realiza el paso de fijación?

### REFERENCIAS

- Madigan, MT.; Martinko, JN.; Parker, J. y Pearson. B. (2013). Biología de los microorganismos. 10° Ed. Madrid. Ed. Pearson - Prentice-Hall.
- Moore, N. M. (2013). Color atlas of medical bacteriology.
- Pfyffer, G. E. (2015). Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Manual of clinical microbiology, 536-569.

Prescott, LM, Harley, JP. y Klein, DA. (2004). *Microbiología*. 5° Ed. Madrid. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning.

## TRABAJO PRÁCTICO N°4 MEDIOS DE CULTIVO

### OBJETIVOS

- Conocer los medios de cultivo más utilizados en microbiología, considerando la composición química, la finalidad metabólica y el uso propuesto para cada uno de ellos.
- Adquirir destreza en la preparación, acondicionamiento, esterilización y almacenamiento de distintos tipos de medios de cultivo.

### INTRODUCCIÓN

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias nutritivas artificiales preparadas en el laboratorio. El material nutritivo, en el que crecen los microorganismos es el **medio de cultivo** (Figura 1) y el desarrollo de los microorganismos es el **cultivo microbiano** (Figura 2).



Figura 1: Medios de cultivos



Figura 2: Cultivo microbiano

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes y sustancias orgánicas indispensables para los procesos metabólicos de los microorganismos (catabolismo–anabolismo) y por consiguiente para el crecimiento de éstos.

Dado que la composición química de cualquier célula es analíticamente semejante, los elementos químicos que necesitan todos los organismos vivos son esencialmente los mismos. Los principales **macroelementos** componentes de las células, que deben encontrarse en el medio de cultivo son: carbono, nitrógeno, hidrógeno, fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro y cloro.

En relación con los principales **microelementos** presentes de las células, que deben encontrarse en el medio de cultivo son: manganeso, cobalto, cobre, zinc y molibdeno.

Sin embargo, estas condiciones no son suficientes para el adecuado desarrollo de los microorganismos, requieren además condiciones fisicoquímicas determinadas.

### TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

- Los microorganismos **mesófilos** crecen en forma óptima entre 20 y 40°C.
- Los **psicrófilos** lo hacen a temperaturas entre 10 a 20°C.
- Los **termófilos** crecen a temperaturas entre 50 a 60°C.

En líneas generales, los **patógenos** humanos crecen en rangos de temperatura mucho menor, alrededor de 35 °C, y los **saprófitos** en rangos más amplios.

**CONDICIONES ADECUADAS DE HUMEDAD:** La presencia de agua en el medio y en la atmósfera es indispensable para el crecimiento microbiano.

**CONDICIONES OSMÓTICAS:** La mayoría de los organismos crecen bien en medios ordinarios. Otros como las bacterias halófilas requieren altas concentraciones salinas. Las levaduras y mohos son xerófilas, es decir crecen en ambientes con concentraciones de humedad muy bajas. Las levaduras osmófilas crecen en medios con altas presiones osmóticas, como puede ser, alta concentración de azúcares.

**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 algunas requieren medios ligeramente ácidos y otras, alcalinas. En algunos casos se les adiciona sustancias tampón, para eliminar los cambios de pH durante el crecimiento.

**OXÍGENO:** Los microorganismos **aerobios** pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal.

Los microorganismos **anaerobios estrictos** sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental, como *Clostridium perfringens*.

- Los microorganismos **microaerófilos** crecen bien si la tensión de oxígeno es inferior a la que precisan los aerobios, como *Streptococcus pyogenes* y *Campilobacter jejuni*.
- Los microorganismos **capnófilos** como *Neisseria meningitidis* (Meningococo) y *Neisseria gonorrhoeae* (Gonococos), crecen mejor si la presión parcial de CO<sub>2</sub> es algo superior a la del aire.
- Los microorganismos **anaerobios facultativos** son capaces de crecer en condiciones aerobias o anaerobias. Éstos pueden utilizar al oxígeno como aceptor final de electrones, pero presentan sistemas alternativos, por los que en ausencia de oxígeno emplean una diversidad de aceptores de electrones. Son ejemplos *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*.

**LUZ AMBIENTAL:** La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias de los géneros *Dolichospermum*, *Oscillatoria* y *Microsystis*.

**ESTERILIDAD DEL MEDIO:** Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente esterilizados para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El método utilizado para esterilizar los medios de cultivo es vapor saturado a presión (ver TP esterilización).

## CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

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

### ESTADO FÍSICO

**1. MEDIOS LÍQUIDOS:** Son llamados comúnmente caldos o infusiones no contienen ningún gelificante. Se utilizan en el manejo de cultivos puros, permiten el crecimiento libre de los microorganismos con una distribución y característica que depende de cada especie o de las necesidades del investigador (Figura 3).

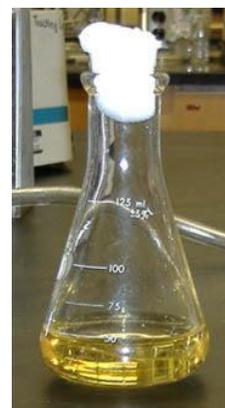


Figura 3: Medio de cultivo líquido

**2. SÓLIDOS O SEMISÓLIDOS:** El gelificante más usado es el **agar**, sustancia obtenida de algas marinas y que en el medio de cultivo resulta inerte. La **agarosa**, también es un gelificante muy utilizado en microbiología, tiene un grado de pureza y transparencia mayor que el agar y la gelatina, producto natural complejo, que además de solidificar el medio provee datos sobre la capacidad proteolítica de algunos gérmenes.

La finalidad de su uso es permitir el crecimiento y la obtención de cultivos puros en el interior o en la superficie sólida o semisólida del medio que contacta directamente con la fase gaseosa (Figura 4).

Los **medios sólidos** tienen de 1,5 % a 2 % de agar en su composición, se utilizan para observar características de las colonias, lograr el aislamiento de los microorganismos, o revelar determinadas propiedades.

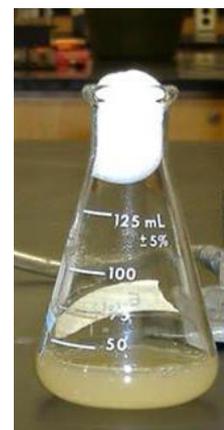


Figura 4: Medio de cultivo sólido

Los **medios semisólidos** tienen de 0,3 % a 0,5 % de agar en su composición, se utiliza para observar algún carácter específico como la movilidad y/o para conservar cepas.

El agar es sólido a temperatura ambiente, hasta aproximadamente 40 °C. Para licuarlo se utiliza la ebullición a baño María.

## NATURALEZA U ORIGEN

**1. MEDIOS NATURALES:** Son aquellos en los que todos sus componentes son sustancias biológicas de las cuales no se conoce su composición cuali y cuantitativa. Por ejemplo, el caldo de carne, pan, frutas. Son útiles para una amplia gama de microorganismos incluidos aquellos cuyo requerimiento de factores de crecimiento no se conoce con exactitud o son múltiples (Figura 5).



Figura 5: Medios de cultivo naturales

**2. MEDIOS ARTIFICIALES O SINTÉTICOS:** Son aquellos de composición química conocida, definida cuali y cuantitativamente. Ejemplos: medios comerciales, permiten la estandarización y repetitividad (Figura 6).



Figura 6: Medios de cultivo artificiales

## FINALIDAD METABÓLICA

**1. MEDIOS GENERALES O NUTRITIVOS:** Es aquel que presenta en su composición la base mínima de nutrientes capaz de permitir el desarrollo del microorganismo en estudio. Son de uso frecuente para el cultivo de microorganismos poco exigentes, también se usan como medio base para otros medios más complejos. Su composición es muy simple, contienen: cloruro de sodio, extracto de carne (fuente de vitaminas y coenzimas), peptona (proteínas parcialmente hidrolizadas) y agua. Se utilizan para el desarrollo, aislamiento y conservación de microorganismos. Ejemplos (Figura 7): caldo nutritivo (CN), agar nutritivo (AN), agar tripteína-soya (ATS).



Figura 7: Medios de cultivo mínimo: A) Caldo nutritivo, B) Agar nutritivo, C) Agar tripteína soya

**2. MEDIOS DIFERENCIALES E INDICADORES:** Son aquellos que permiten determinar características metabólicas o marcadores genéticos del microorganismo, sin inhibir sus funciones fisiológicas. En estos se incluyen diversos colorantes e indicadores de pH y otros componentes, que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a identificar a las bacterias aisladas. Estos medios no contienen sustancias inhibitorias. Ejemplo: Agar azul de bromotimol-lactosa-cistina (CLDE) permite la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa de las No fermentadoras. La degradación del hidrato de carbono a ácido origina un viraje del color hacia el amarillo del Azul de Bromotimol. En tanto que la alcalinización provoca un viraje hacia el azul intenso (Figura 8).

Por otra parte, en los últimos años se han producido avances significativos en la formulación de medios de cultivos diferenciales con la aparición de los **medios cromogénicos** y **fluorogénicos**. Estos medios incluyen en su composición compuestos cromogénicos y fluorogénicos (incoloros o débilmente coloreados y no fluorescentes) que son sustratos de enzimas específicas. Cuando la enzima



Figura 8: Medio diferencial CLDE

actúa sobre el sustrato cromogénico o fluorogénico, éste sufre un cambio de estructura formándose una nueva estructura molecular coloreada o fluorescente. Los sustratos cromogénicos cuando son transformados por acción de su enzima específica cambian de color debido a la transformación química de la parte cromogénica que cambia de estructura, produciendo un cromóforo coloreado, (estructura química responsable del color) (Figura 9). La interacción entre los microorganismos y los sustratos cromogénicos depende del tipo del sustrato usado, la sustancia coloreada producida puede quedar absorbida en el interior de la

célula bacteriana coloreando la colonia o difundir en el medio de cultivo produciendo un cambio de color en éste. En la actualidad se dispone de diversos sustratos cromogénicos (habitualmente derivados halogenados del indoxilo). Si en un mismo medio se combinan varios de estos sustratos es posible detectar de

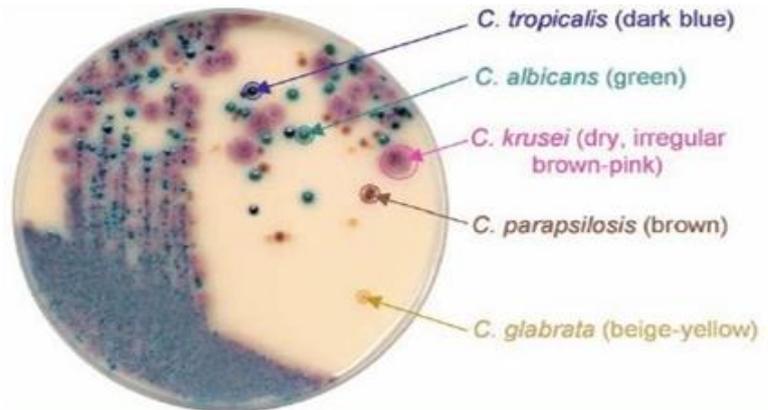


Figura 9: Medio de cultivo cromogénico

forma simultánea diversas actividades enzimáticas y llegar directamente (o tras efectuar sobre la colonia otras pruebas bioquímicas rápidas) a una **identificación presuntiva** de las colonias bacterianas sin necesidad de subcultivar y realizar pruebas bioquímicas adicionales.

**3. MEDIOS ENRIQUECIDOS:** Son aquellos que, a un caldo nutritivo o agar nutritivo (es decir, un medio “base”, se los provee de componentes como sangre, suero, extractos de tejidos vegetales o animales. Estos componentes le proporcionan nutrientes adicionales al medio, por lo que permite el desarrollo de bacterias exigentes. Se debe tener presente que algunos medios base son considerados medios enriquecidos sin ningún otro agregado, debido al alto contenido de nutrientes que poseen. Es un ejemplo de medio enriquecido el Caldo infusión Cerebro Corazón (ICC).

**Agar sangre:** el porcentaje de sangre a inocular es del 5 % v/v a una base de agar fundido y enfriado a 45-50 °C. Es adecuado para el **cultivo de bacterias exigentes** como *Streptococcus pneumoniae* (neumococos). Es además un **medio diferencial** porque pone de relieve una **hemolisina** bacteriana que permite diferenciar las especies hemolíticas de las no hemolíticas (Figura 10).

Se observa alrededor de las colonias la formación de dos tipos de halos:

**Halo transparente:** que denota una *hemólisis total*, que corresponde a las especies beta hemolíticas: estreptococos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) y algunos del grupo D (*Enterococcus* spp.).

**Halo verdosos:** que denota una *hemólisis parcial*, y corresponde a las especies alfa-hemolíticas como estreptococos del grupo *viridans* y neumococos.

**Sin halo:** son especies no hemolíticas, a las cuales se las denomina gama-hemolíticas o *an hemolíticas*.

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

**Agar chocolate:** en su preparación se agrega sangre a una base de agar fundido y enfriado a 50 °C y luego se calienta a 80 °C, agitando con el cuidado de no producir espuma, hasta que se logra un *color marrón* (Figura 11). Se han liberado de la sangre al medio los dos factores, (el factor X y el factor V). El factor X es empleado por los microorganismos para elaborar citocromo y otros pigmentos respiratorio-aeróbicos. El factor V actúa como receptor intermediario de hidrógeno en los mecanismos respiratorios. Los estafilococos liberan el factor V en cantidad suficiente como para estimular el desarrollo de otros gérmenes como *Haemophilus influenzae* que no lo produce; de ahí que si se siembra en una placa de agar sangre que solo contenga el factor X ambos microorganismos, *H. influenzae* desarrollará formando colonias mucho más grandes alrededor de las colonias de *Staphylococcus aureus* en el clásico fenómeno de satelitismo.

El agar chocolate es un **medio enriquecido** ideal para el **aislamiento** de *H. influenzae*, gonococos y meningococos.

**4. MEDIOS SELECTIVOS:** Si los requerimientos nutricionales de un microorganismo son conocidos es posible desarrollar un conjunto de condiciones en las que su crecimiento específico sea favorecido y el de otros, impedido, permitiendo así su aislamiento a partir de poblaciones mixtas aun cuando esté en menor proporción.

La adición de ciertas sustancias químicas al cultivo impide el desarrollo de un grupo de bacterias sin inhibir a otros. Estos agentes selectivos son muy útiles para detectar la presencia de patógenos específicos en una microbiota mixta y para su identificación. Ejemplo: Caldo MacConkey (Figura 12).



Figura 10: Medio de cultivo  
Agar sangre

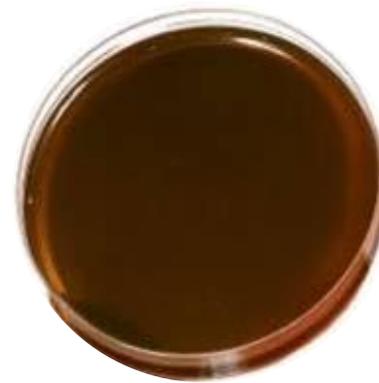


Figura 11: Medio de cultivo  
Agar chocolate

Comúnmente se utilizan como agentes selectivos:

**Cloruro de sodio** en altas concentraciones inhibe a casi todas las bacterias excepto las halófilas.

**Citrato de sodio** sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio.

**El telurito de sodio** puede ser añadido al medio de cultivo

para aislar bacterias con una resistencia fisiológica inherente a su toxicidad.

**El selenito de sodio** permite el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp.

**Sales biliares** (desoxicolato de sodio) inhibidora del crecimiento de bacterias Gram (+).

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

**Antimicrobianos**, como ser cloranfenicol, cicloheximida, sulfamidas, colistina, etc.

**Agentes reductores** también se adicionan a los medios para hacerlos selectivos y promover el desarrollo de microorganismo anaerobios. Ejemplo: Ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, cisteína, etc.

Dentro de los medios selectivos hay variación en cuanto a su **poder inhibitor**:

- Ligeramente selectivo
- Medianamente selectivos
- Altamente selectivo o inhibidores

**Agar EMB:** (agar eosina-azul de metileno) es **ligeramente selectivo** y utilizado para el aislamiento de bacilos entéricos. Permite también la diferenciación de *E. coli*, *Enterobacter* y otros microorganismos (Figura 13). Los colorantes contenidos en su fórmula inhiben a muchas bacterias Gram (+). El medio contiene también lactosa que es degradada por la *E. coli* y coliformes, el ácido producido por la degradación de este azúcar y la mezcla de los colorantes eosina y azul de metileno, produce el cambio de coloración de estos y su precipitación. Las colonias de *E. coli* aparecen negro-verdosas con brillo metálico; las de *Enterobacter*, con centro

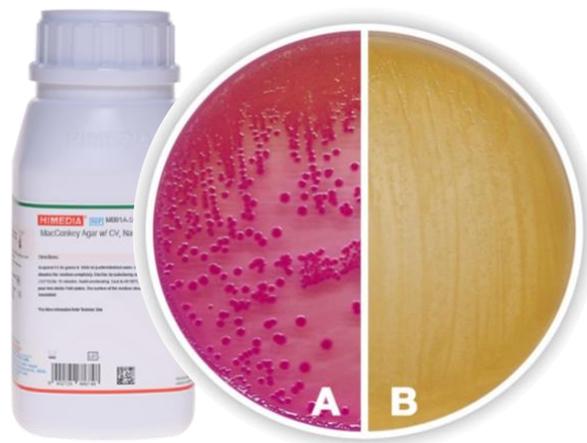


Figura 12: Medio de cultivo selectivo Mac Conkey  
A: *Enterobacter aerogenes*. B: *Shigella dysenteriae*

violeta o pardo oscuro y periferia violeta pálido sin brillo metálico o solo en el centro, *Salmonella* y *Shigella* desarrollan colonias transparentes.

**Agar Mac Conkey:** Medio **medianamente selectivo**, posee una mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe a los microorganismos Gram (+); además poseen lactosa y rojo neutro como indicador de pH. El aumento en la acidez del medio por la acción fermentadora de las bacterias lactosa (+), produce una coloración roja en sus colonias (Figura 12A), las bacterias no fermentadoras: Lactosa (-), se presentan en colonias incoloras (Figura 12B).

**Agar *Salmonella Shigella* (SS):** Medio **altamente selectivo** usado en el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos, etc. El verde brillante, las sales biliares y una elevada concentración de tiosulfato y citrato, inhibe la microbiota acompañante. Con el tiosulfato y los iones férricos se pone de manifiesto la formación de sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento de las colonias, al precipitar el sulfuro de hierro (Figura 13).



Figura 13: Medio de cultivo altamente selectivo *Salmonella-Shigella*

**Agar Bismuto sulfito:** medio **selectivo y diferencial** para el aislamiento de *Salmonella*. El verde brillante y el bismuto sulfito inhiben considerablemente a los microorganismos acompañantes. Las colonias de *Salmonella* H<sub>2</sub>S (+) presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias (Figura 14).

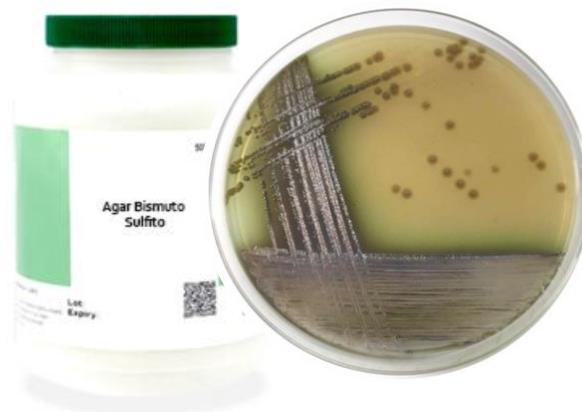


Figura 14: Medio de cultivo selectivo y diferencial Agar Bismuto sulfito

**Agar Manitol Salado:** es utilizado para la **demonstración de estafilococos patógenos**. La concentración extremadamente alta de cloruro de sodio (7,5 %) permite el crecimiento de microorganismos tolerantes. También contiene manitol, cuya degradación lleva a la formación de ácidos, está notablemente correlacionada con la patogenicidad y sirve para detectar la

presencia de *S. aureus*. La acidez produce en el medio cambio de color (de rojo a amarillo), por viraje del indicador rojo de fenol. Las colonias de *S. aureus* tienen un crecimiento intenso, con formación de un halo amarillo luminoso por ser organismos manitol (+) *Staphylococcus epidermidis* tiene un crecimiento débil casi siempre y no produce cambio de color por ser organismos manitol (-) (Figura 15).



Figura 15: Medio de cultivo Agar Manitol salado

**Agar Thayer Martin:** Es un medio altamente selectivo. Cuenta con el agregado de una mezcla liofilizada de vancomicina, colistin sulfato, trimetoprima y nistatina, más aditivos estimulantes del crecimiento. Es un medio ideal para el aislamiento selectivo de gonococos y meningococos porque inhibe la microbiota acompañante incluida las saprofitas (Figura 16).



Figura 16: Medio de cultivo Agar Thayer Martin

**Agar Baird Parker:** Es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *S. aureus*, coagulasa positiva. Contiene cloruro de litio y telurito para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, mientras que el piruvato y la glicina incluidos promueven el crecimiento de estafilococos (Figura 17).



Figura 17: Medio de cultivo Agar Baird Parker

## USOS

**1. MEDIOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS:** Utilizados para la determinación de propiedades bioquímicas de los microorganismos, que, junto a otras características o marcadores genéticos, permiten su identificación. Ejemplos: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI: *Triple Sugar Iron*, por su sigla en inglés, permite conocer la capacidad de los microorganismos para metabolizar los distintos azúcares presentes); Fenilalanina desaminasa (FDA: identificación del metabolismo proteico); Sulfhídrico-Indol-Movilidad (SIM), entre otros (Figura 18).



Figura 18. Medios de cultivo para pruebas bioquímicas.

**2. MEDIOS PARA RECuento DE BACTERIAS:** Se emplean para la enumeración de bacterias contenidas en materiales tales como agua, leche, productos lácteos. Ejemplo: Plate count agar (PCA) o agar cuenta gérmenes. Estos medios no contienen sustancias inhibitorias y se utilizan para recuento total de microorganismos (Figura 19).

**3. MEDIOS DE TRANSPORTE:** Pueden ser líquidos o semisólidos, los cuales mantienen viables los microorganismos durante un tiempo variable. 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. Ejemplo: medio de Stuart consiste en un agar semisólido tamponado (contiene sales que actúan como *buffer*), está exento de sustancias nutritivas y contiene tioglicolato de sodio como agente reductor. Este medio mantiene un pH favorable e impide la deshidratación de las muestras durante su traslado, así como la oxidación y la autodestrucción enzimática de los gérmenes

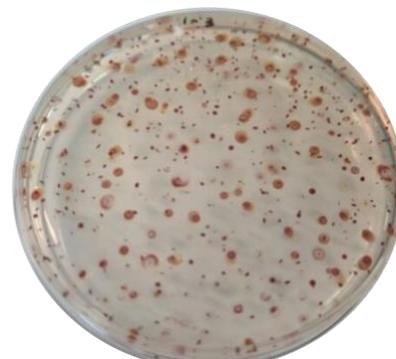


Figura 19: Medio de cultivo para recuento

patógenos presentes. Otro medio es el de Cary Blair semejante al anterior, contiene tioglicolato de sodio, Fosfato de sodio, NaCl y agar al 5% (Figura 20).



Figura 20: Medios de transporte

**4. MEDIOS DE MANTENIMIENTO:** Son aquellos que permiten la viabilidad y multiplicación de los gérmenes si se mantienen las condiciones óptimas para el desarrollo. Ejemplo: agar o caldo infusión cerebro corazón (ICC) (Figura 21).

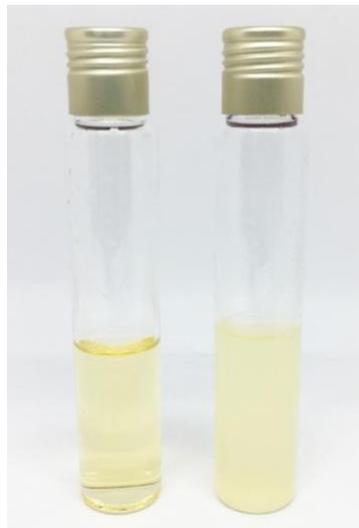


Figura 21: Medio de mantenimiento: Caldo ICC

## PASOS A SEGUIR PARA LA PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO

### 1. PESAR LOS COMPONENTES

Se utilizan instrumentos adecuados (ejemplo: balanza analítica) para pesar cada uno de los componentes según las indicaciones especificadas en el medio de cultivo.

### 2. DISOLUCIÓN DE LOS COMPONENTES

- Los recipientes destinados a la preparación de los medios de cultivo (Erlenmeyer) deben estar limpios y ser lo suficientemente grandes de tal forma que quede una cámara de aire para que se pueda agitar con facilidad y evitar que se moje el tapón de algodón.
- Se hidrata añadiendo la mitad del volumen necesario de agua destilada y/o desmineralizada, con pH neutro. Se agita hasta conseguir una suspensión homogénea luego se incorpora el volumen de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridos a la pared interna del recipiente.
- Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario.
- Los medios de cultivo que no contienen agar ni gelatina se pueden disolver en agua fría o bajo ligero calentamiento.
- Los medios de cultivo que contienen agar o gelificantes deben ser calentados a baño María para conseguir su disolución.
- En caso de medios de cultivo que no deban ser sometidos a una posterior esterilización en autoclave, es imprescindible utilizar agua previamente esterilizada y prepararlo en condiciones de esterilidad. Al momento de fundir, atender a su disolución completa.

### 3. DISTRIBUCIÓN

Es conveniente, fraccionar antes de esterilizar el medio de cultivo en los recipientes definitivos como tubos de ensayo, (Figura 22). Se debe cuidar que durante la operación el medio de cultivo permanezca caliente, para evitar que se solidifique.

Según el uso se fracciona del siguiente modo:

- Tubos para *punción* cargar  $1/5$  ó  $1/4$  de su altura.
- Tubos para *estrías* cargar  $1/3$  ó  $1/2$  de su altura
- Tubos con medio *líquido* cargar 2,5; 5 y 10 mL

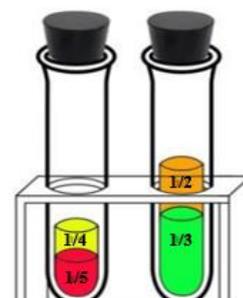


Figura 22: Fraccionamiento de medios de cultivo en tubo de ensayo

#### 4. ACONDICIONAMIENTO

Una vez finalizada la preparación del medio de cultivo, aquellos que NO se fraccionan antes de ser esterilizados, se los conserva en el Erlenmeyer elegido para su preparación, a éste se le coloca un tapón de algodón, protegido por una capucha de papel ajustada con una banda elástica (Figura 23A). Los medios de cultivo que se fraccionan en tubos de ensayo antes de ser esterilizados, se cierran con tapones de goma o algodón y se colocan en una cesta de alambre o lata, protegidos por una capucha de papel ajustada con una banda elástica (Figura 23B).

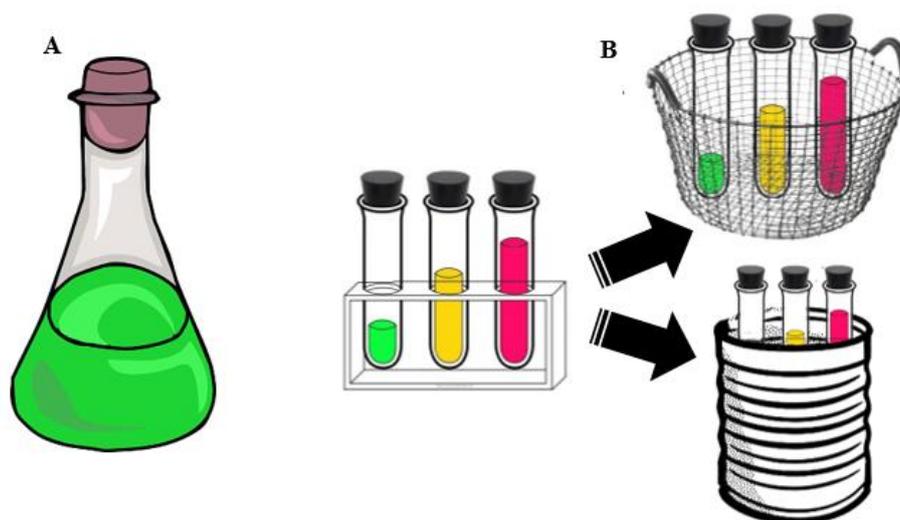


Figura 23: Acondicionamiento de medios de cultivo para esterilizar: A. Erlenmeyer; B. Tubo de ensayo

#### 5. ESTERILIZACIÓN

Si las indicaciones del fabricante no indican otra cosa, la esterilización se realiza en autoclave a 121 °C, 1 atmósfera de presión y durante 15 minutos. Temperaturas más altas y calentamientos más prolongados, perjudican la calidad del medio de cultivo.

#### 6. VERTIDO EN PLACAS

Una vez esterilizados los medios de cultivo y al momento de utilizarlos se distribuyen asépticamente en placas de Petri estériles, aproximadamente 20 mL en cada una (Figura 24A). Tener la precaución de dejar enfriar el medio a una temperatura de 45-50 °C, para evitar la condensación de agua en la tapa de las placas.

Para secar la superficie húmeda del agar, se colocan en estufa a 30-40 °C durante 30 minutos. Para ello se posicionan las placas de Petri con su cara interna hacia abajo, algo destapada sobre la tapa que ahora sirve de apoyo a la placa, con la finalidad de evitar la contaminación de las mismas (Figura 24B).

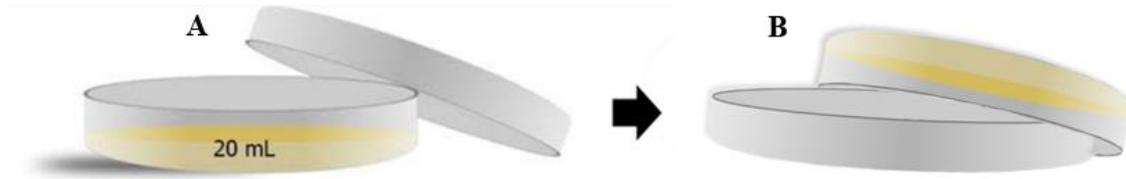


Figura 24: Vertido en placa. A. Distribución del medio en placa de Petri; B. Secado del medio con la placa invertida

## 7. TUBOS PARA AGAR INCLINADO – PICO FLAUTA – ESTRÍA

Los tubos con medio de cultivo esterilizado, todavía líquidos se colocan en una posición inclinada, de tal forma que se forme una capa de aproximadamente 3 cm y una superficie de iguales dimensiones, aguardando su solidificación (Figura 25).



Figura 25: Tubo para agar inclinado / pico de flauta

## 8. CONSERVACIÓN

Los medios de cultivos estériles, listos para su uso, tienen un tiempo limitado de conservación en condiciones adecuadas:

- A temperatura ambiente 1- 2 semanas protegidos de la luz.
- A 12 - 15 °C más de 2 semanas.

Los medios de cultivo con agar no deben guardarse a temperatura inferior al punto de congelación (0 °C) ya que se altera la estructura del gel, provocando el precipitado o la cristalización de ciertas sustancias del medio, como así también originar grietas en las placas que contengan el medio de cultivo.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la preparación, distribución, acondicionamiento y esterilización de diversos medios de cultivo, con el propósito de utilizarlos posteriormente en las prácticas microbiológicas.

### ACTIVIDAD N°1: PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

- A) Leer las instrucciones del fabricante, realizar el cálculo según el volumen a preparar, pesar.
- Preparar siguientes medios de cultivo líquidos y agarizados
  - 50 mL de **medio mínimo**: caldo tripteína soya. Fraccionar 5ml por tubo.
  - 50 mL de **medio para prueba bioquímica**: SIM. Fraccionar en tubos hasta  $\frac{1}{4}$  del mismo.
  - 50 mL de **medio mínimo**: agar tripteína soya. Fraccionar en tubos hasta la mitad.
  - 100 mL de **medio selectivo**. Conservar en el Erlenmeyer
  - 100 mL de **medio agar base**. Conservar en Erlenmeyer. Este medio se destinará a la preparación de **medio diferencial**: agar sangre o **medio enriquecido**: agar chocolate.
- B) Acondicionar.

### ACTIVIDAD N°2: CONTROLES DE ESTERILIZACION Y ESTERILIDAD

Realizar controles de esterilización y esterilidad a los medios de cultivo:

**A. Control de esterilización biológico:** Tomar un tubo con caldo nutritivo preparado en la actividad N°1 e inocular esporas *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, esterilizar con los demás tubos e incubar al finalizar el proceso de esterilización a 37 °C por 24 h. Observar los resultados.

**B. Control de esterilidad:** Tomar un tubo de ensayo con medio en estría preparado en la actividad N°1 y llevar a estufa 37 °C por 24 h y 48 h. Observa los resultados.

### ACTIVIDAD N°3: ESTERILIZACION

Esterilizar los diferentes medios de cultivo, según instrucciones del fabricante.

### ACTIVIDAD N°4: TUBOS PARA AGAR INCLINADO

Una vez retirados del autoclave, mientras el agar aún está fundido, inclinar los tubos a 30° aproximadamente para formar las estrías.

## ACTIVIDAD N°5: CONSERVACION

Conservar los medios de cultivo en lugar seco, fresco y al resguardo de la luz.

### CUESTIONARIO GUÍA

#### Utilizar la bibliografía de consulta y responder

1- ¿Qué importancia tienen los macro y microelementos en la composición química de los medios de cultivo?

2- ¿Qué componentes de los medios de cultivo los convierten en medios selectivos y/o diferenciales? Justifique.

3- Justifique la utilización de agar y gelatina en los medios de cultivo.

**A.** Redacte un párrafo referente a la absorción de los nutrientes realizada por los microorganismos.

**B.** Complete el siguiente cuadro, para ello realice una búsqueda en Manuales de medios de cultivo comerciales: Merck, Britania, etc.

Medio de cultivo	Uso	Fundamento	Composición Química	Instrucciones
Agar Manitol salado				
Agar EMB				
Agar cetrimide				
Agar Müller Hinton				
Caldo tioglicolato				

**C.** En el aula virtual de la asignatura se encuentra disponible el audiovisual Preparación de Medios de Cultivos: para bacterias y para hongos

1- Observe el material audiovisual y reflexione entre similitudes y diferencias entre los mismos.

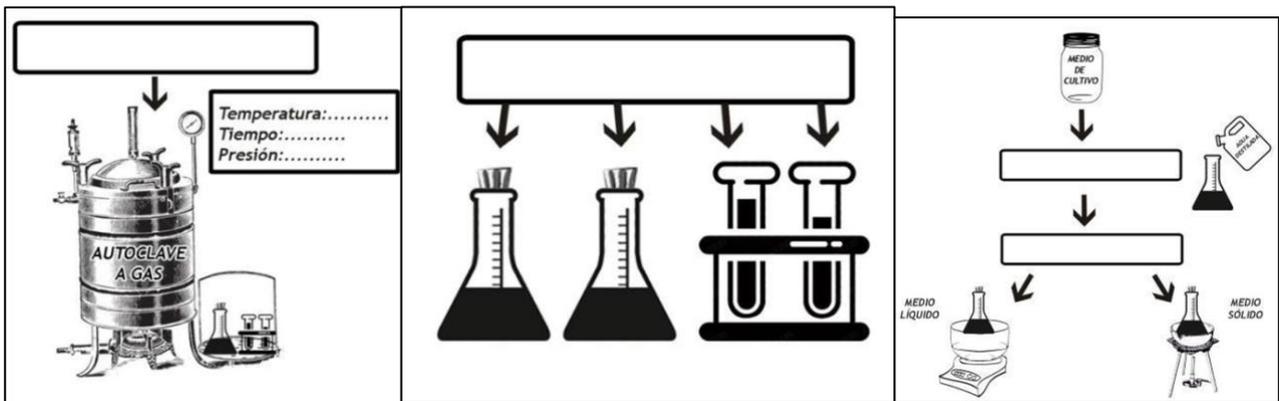
2- ¿Cómo se realiza el cálculo de la cantidad (en gramos) de medio de cultivo deshidratado, destinado a los siguientes volúmenes: 75 mL 100 mL y 125 mL? Ejemplifique.

**D.** Complete: los siguientes textos ¿En qué momento se:

- 1- Limpia el área de trabajo y ¿con qué?
- 2- Esteriliza un medio de cultivo. Justifique.
- 3- Fracciona en tubos, medios líquidos.
- 4- Fracciona en tubos los medios agarizados.
- 5- Fracciona en placas Petri.
- 6- Realiza agar inclinado o pico flauta.
- 7- Ajusta el pH.
- 8- Incorpora la sangre

**E.** Realice una búsqueda en la web de material audiovisual sobre la preparación de agar sangre y chocolate. Fundamente las diferencias entre ambos medios.

**F.** Las siguientes imágenes corresponden a la preparación de medios de cultivo. Complete los recuadros y ordene la secuencia según corresponda.



**G.** Marque con una X el tipo de medio de cultivo que utiliza en cada ítem.

	Líquido	Semisólido	Sólido
Obtener cultivos puros			
Multiplicación masiva de M.O.			
Desarrollo de M.O en diferentes tensiones de O <sub>2</sub>			
Recuento de células viables			
Antibiograma			
Observación macroscópica de colonias			
Evaluar la movilidad microbiana			

## **REFERENCIAS**

Hurst, C. J., Crawford, R. L., Garland, J. L., & Lipson, D. A. (Eds.). (2007). Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology Press.

Jorge Luna, F. (2012). Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología. Editorial Unimagdalena.

Madigan, M.T.; Martinko, J.N.; Parker, J. y Pearson. Brock (2013). Biología de los microorganismos. 10° Ed. Madrid. Ed. Pearson - Prentice-Hall.

Prescott L.M, Harley J.P. y Klein D.A. (2004). Microbiología. 5° Ed. Madrid. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

## TRABAJO PRÁCTICO N°5

### SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

#### OBJETIVOS

- Adquirir destreza en diferentes metodologías de siembra de microorganismos.
- Realizar el aislamiento de una especie bacteriana a partir de una muestra.
- Observar colonias microbianas e interpretar su morfología en los distintos medios de cultivo.
- Reconocer la importancia de la técnica de siembra para aislamiento, como paso inicial para la tipificación bacteriana.

#### INTRODUCCIÓN

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

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

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

La esencia de la microbiología la integran dos clases de operaciones: **el cultivo o siembra**, que es el crecimiento de poblaciones microbianas en ambientes artificiales (medios de cultivo) bajo condiciones de laboratorio, y **el aislamiento**, que es la separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza.

#### CULTIVO O SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

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

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

### **FINALIDAD DE LA SIEMBRA**

La inoculación o siembra de microorganismos en medios adecuados se realiza con la finalidad de:

- **Subcultivo:** Esta siembra se realiza en las siguientes situaciones:

1. Cuando el medio original se agota de nutrientes, se procede a trasladar una porción del cultivo a un nuevo medio que presenta proporciones óptimas de nutrientes. Este método se utiliza, por ejemplo, en el mantenimiento de cepas microbianas para favorecer un desarrollo continuo.
2. Cuando se busca obtener un número significativo de microorganismos, con el propósito de establecer un cultivo axénico para llevar a cabo estudios adicionales, tales como pruebas bioquímicas y evaluación de sensibilidad a antimicrobianos.
3. Cuando se introduce una única especie bacteriana en diversos medios apropiados con el fin de fomentar su reproducción y observar su comportamiento, definir propiedades, entre otros aspectos. Este enfoque se emplea comúnmente en la identificación de bacterias mediante la utilización de medios específicos.

- **Aislamiento:** Esta siembra se realiza cuando se desea separar entre sí especies bacterianas contenidas en un material o muestra. Debe realizarse siempre **en medios sólidos en placas de Petri**.

### **REQUISITOS DE LA SIEMBRA**

- Medios de cultivo adecuado y estéril.
- Realizar todos los procedimientos con las más rigurosas técnicas de asepsia.
- Contar con los materiales de rutina necesarios (entre ellos: material a sembrar, pipetas, ansas, mecheros, soluciones desinfectantes, etc.).

## ELEMENTOS DE LA SIEMBRA

**Asa/Ansa:** Está confeccionada de un alambre de platino u otro material inserto en un mango para facilitar su manejo. Existen distintos tipos de ansas que se emplean en función del procedimiento microbiológico que se requiera realizar (Figura 1):

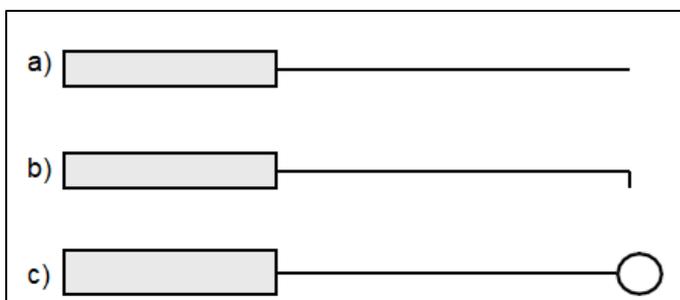


Figura 1: Asa /ansas empleadas en la siembra de microorganismos:  
a) Recta o Aguja, b) en L, c) Ojal

- **Ansa recta o aguja:** Es un alambre recto fijado a un mango. Se emplea para transferir colonias de una placa a otra, sobre todo para la inoculación de medios sólidos y semisólidos en tubos.
- **Ansa en L:** Es un alambre recto con el extremo doblado a 90°. Se emplea en diversas operaciones microbiológicas para la transferencia precisa de microorganismos, ayudando a evitar la contaminación cruzada y facilitando la manipulación de cultivos bacterianos.
- **Ansa ojal:** Es un alambre que en su extremo anterior tiene la forma de un círculo cerrado de 2-3 mm de diámetro. Se emplea para realizar estrías en la superficie de medios de cultivo sólidos y para la transferencia a otro medio o superficie de colonias completas.

**Hisopos:** Son muy útiles para realizar la etapa inicial de la siembra, conocida como inóculo primario, utilizando la muestra original. Además, los hisopos son eficaces para transferir cultivos líquidos a placas de agar, así como para llevar a cabo inoculaciones masivas utilizando suspensiones de colonias aisladas.

**Jeringa:** Son especialmente idóneas para la inoculación de muestras obtenidas por punción y transportadas en su interior. Además, se utilizan con eficacia en la realización de subcultivos en placas a partir de frascos de hemocultivo, y para la transferencia de cultivos líquidos.

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

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

**Espátula de Drigalski:** Es una varilla fina de vidrio, acodada en ángulo recto en uno de sus extremos en forma de L o de triángulo equilátero. Se emplea generalmente para inoculación masiva en la superficie de las placas. Su utilidad se destaca especialmente en el análisis de muestras de alimentos, así como en estudios de identificación de hongos y levaduras. (Figura 2).



Figura 2 Espátula de Drigalsky

## TECNICAS Y METODOS DE SIEMBRA

- **Subcultivos de microorganismos**

El cultivo de microorganismos puede hallarse en un tubo con medio líquido (como caldo nutritivo), en un tubo con medio semisólido (como medios SIM o BAM), o en un tubo inclinado o placa de Petri con medio sólido (como medios CLDE, Mac Conkey, SS, etc.)

### 1) Siembra a medios líquidos: Desde un medio líquido:

Se cuenta con un medio líquido que contiene microorganismos, previamente inoculado. En este medio, los microorganismos han proliferado, lo cual se manifiesta mediante turbidez, formación de película o sedimentación. El objetivo es transferir una porción de este cultivo a otro tubo con un caldo nuevo.

Paso 1: **HOMOGENEIZAR.** Antes de realizar la siembra al nuevo caldo, se debe homogeneizar el medio de cultivo original, para que la carga microbiana por unidad de volumen sea homogénea en todo el caldo de cultivo (Figura 3).

A. Se puede homogeneizar el contenido líquido del tubo, correctamente tapado, con un movimiento de rotación (Figura 3A).

B. Se puede agitar vigorosamente con el ansa ojal previamente esterilizada (Figura 3B).

Paso 2: **SEMBRAR.** Una vez homogeneizado el tubo original, se procede a la siembra, para ello se toman ambos tubos (el original y el nuevo) con la mano menos hábil.

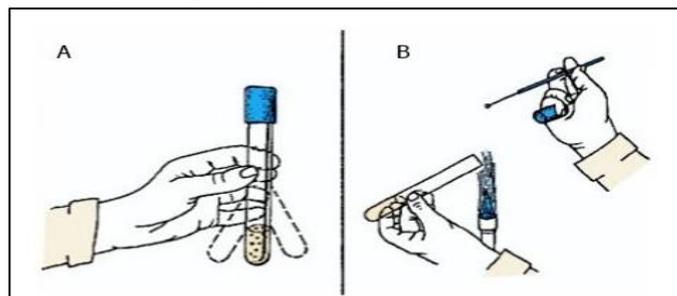


Figura 3: Métodos de homogeneización de medios de cultivo líquidos

A. En la mano libre se tendrá el ansa esterilizada en la llama del mechero, con la que se procederá a realizar la siembra. Con los dedos meñique y anular de dicha mano, se destapan los tubos de ensayo (al abrigo de la llama) (Figura 4A).

B. Se introduce el ansa en el tubo original, se agita y carga con el inóculo, el cual se descarga en el tubo con caldo nuevo (Figura 4B).

C. Se tapan nuevamente los tubos con los tapones antes retirados (Figura 4C) y se esteriliza el ansa a la llama del mechero, dejándola luego sobre la mesada (Figura 4D).

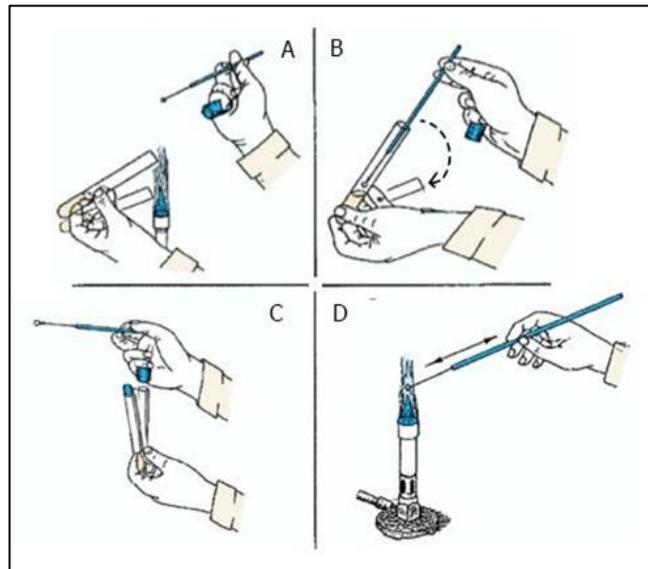


Figura 4: Siembra a medios líquido, desde un medio líquido

Paso 3: **ROTULAR.** Una vez realizada la siembra, se rotula el nuevo tubo sembrado.

En el rótulo deben incluirse datos correspondientes al inóculo:

- Microorganismo sembrado o material.
- Fecha de siembra
- Medio de cultivo utilizado.
- Nombre del laboratorista.

## 2) Siembra a medios líquidos: Desde un medio sólido

Para la siembra de un microorganismo proveniente de un medio sólido, se deben seleccionar aquellas placas con colonias aisladas, asegurándose de tocar solo una colonia con el ansa aguja estéril (Figura 5A). Dicha ansa cargada con el inóculo se acerca al borde del medio líquido nuevo con el tubo inclinado (Figura 5B) y suavemente se incorpora el inóculo al caldo. Luego se endereza el tubo y se lo mueve para permitir que el inóculo difunda a todo el caldo.

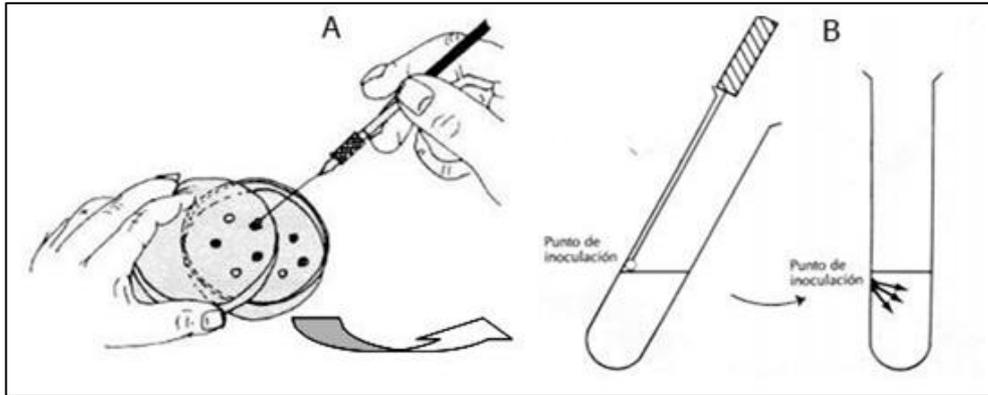


Figura 5: Siembra a medio líquido, desde un medio sólido

### 3) Siembra a medios semisólidos:

Se utiliza el método de la picadura o punción, útil fundamentalmente para la observación de la motilidad de los microorganismos. En estos casos se utiliza ansa aguja estéril. Para la siembra se utilizan medios semisólidos (con agar al 0,5 - 0,8 %) en tubos de ensayo, solidificados de forma horizontal. Se realiza una punción central y vertical con el ansa cargada con el inóculo, cuidando de retirarla por la misma perforación practicada al penetrar al medio con ella (Figura 6A). Un movimiento en abanico (Figura 6B) durante la inoculación de este medio puede dar como resultado un patrón de desarrollo a lo largo de la línea de siembra que se puede interpretar falsamente como movilidad bacteriana. Una vez retirada la aguja, se tapa el tubo y se lleva a incubar.

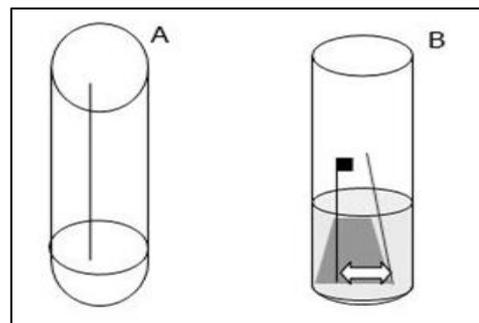


Figura 6: Siembra a medio semisólido

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

### 4) Siembra a medios sólidos:

La siembra a un medio sólido puede realizarse en placas de Petri o bien en tubos de ensayo con agar inclinado o en pico de flauta, tomando el inóculo proveniente de medios líquidos o sólidos.

#### 1. Método de extensión con espátula o diseminación

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

y se disemina en todas direcciones con la espátula (Figura 7). Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

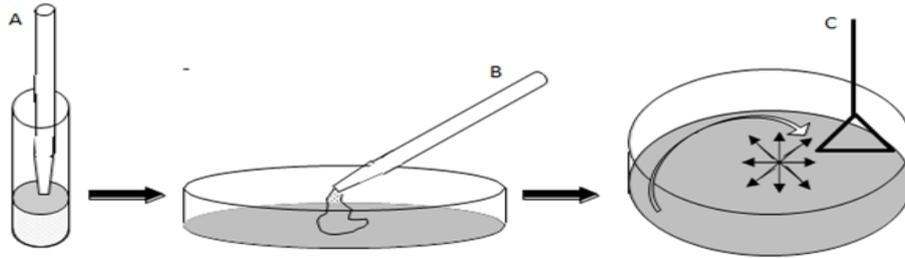


Figura 7: Método de siembra por extensión o diseminación. A. se toma el inóculo con la pipeta estéril; B. se deposita el inóculo en la placa de Petri; C. con la espátula se disemina en diversas direcciones.

**2. Agotamiento en estría:** Puede ser realizado en tubos con agar inclinado o en placas de Petri (de preferencia). En este tipo de siembra se utilizan inóculos tomados con el anillo del ansa ojal estéril y se siembran directamente; o bien se practican diluciones con factor conocido, y se siembran en distintas placas.

**A. En tubos.** Los tubos con agar en pico de flauta, se pueden sembrar en “S” sobre la superficie inclinada, o inocular primero atravesando el agar (siembra en profundidad) y luego de retirar el ansa de la parte profunda, continuar estriando sobre la superficie (Figura 8).

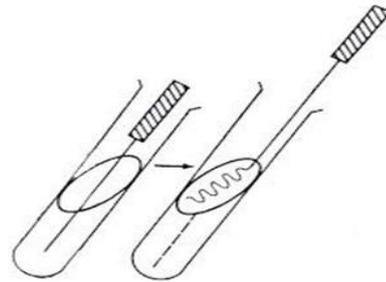


Figura 8: Siembra en tubo con medio sólido.

### **B. En placa de Petri.**

Se toma el inóculo con el ansa ojal, previamente esterilizada y se deposita en uno de los extremos superiores de la placa; a partir de aquí se realizarán movimientos en zig zag de un extremo a otro de la placa, sin volver a tomar un nuevo inóculo y sin levantar el ansa hasta concluir la siembra de toda la placa.

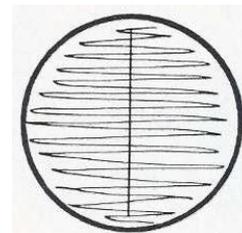


Figura 9: Siembra por agotamiento de estrías en placa.

## Aislamiento de microorganismos

En la práctica, la **separación o aislamiento** del inóculo se realiza sobre la superficie del agar para obtener colonias bacterianas aisladas; luego, las UFC se pueden subcultivar individualmente en medios diferenciales (Figura 10).

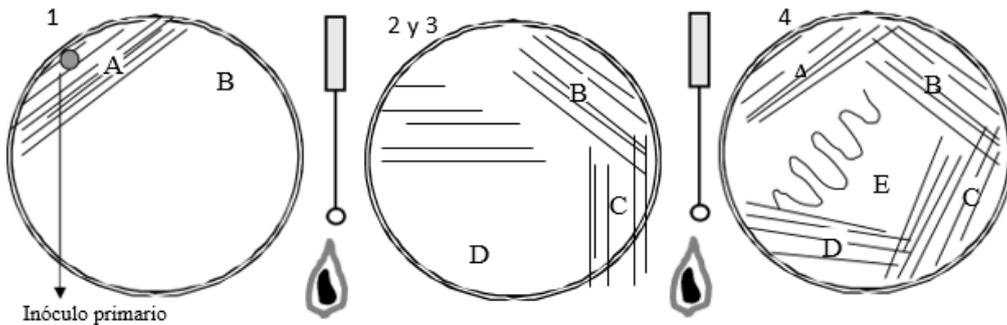


Figura 10: Método de aislamiento por agotamiento de estría.

### Técnica de aislamiento microbiano:

1. Se carga el ansa con el inóculo desde un tubo con caldo de cultivo o mediante el toque de una colonia aislada en placa de Petri. Luego se toma la base de la placa de Petri donde se encuentra el medio de cultivo sólido fresco, y se la levanta hasta la altura de la llama del mechero, a unos 20 cm de la misma.
2. Rápidamente para evitar la contaminación, se realiza con el anillo del ansa, movimientos de zig - zag de forma tal que marque estrías sobre la superficie del agar, depositando así en forma esparcida el inóculo (A).
3. Se gira la placa 60°, se quema el ansa, se enfría y se procede a un nuevo estriado en la Zona B, cuidando de tocar solamente las dos últimas estrías del cuadrante anterior y tratando de realizar un gran número de estrías, muy cercanas entre sí.
4. Se gira nuevamente la placa otros 60°, se quema el asa, se enfría y se procede al estriado de la zona C. Se repite el procedimiento para la zona D y sin quemar el asa se realiza la cola de pescado en la zona E. A medida que progresa la siembra (o sea mayor cantidad de estrías hechas), el inóculo inicial tiene cada vez menor carga bacteriana, quedando por ende en las últimas estrías (zona E y a veces en la zona D) los gérmenes más separados unos de otros, formando así, con su desarrollo colonias separadas y de límites diferenciados.
5. Tapar las placas. Incubar

## INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

La interpretación de los cultivos primarios luego de 24-48 h de incubación, requiere una considerable destreza. El microbiólogo debe evaluar si hubo desarrollo microbiano en medios líquidos o sólidos y decidir si se requieren procedimientos adicionales. Esta evaluación puede ser macroscópica, como se describe más abajo, o microscópica.

La observación de las características microscópicas de las bacterias es esencial para obtener información detallada sobre su estructura celular, lo que, a su vez facilita la clasificación y la identificación precisa de los organismos (Ver TP microscopia, examen en fresco y tinción de microorganismos).

### Evaluación de medios líquidos

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

- Presencia de grumos (Figura 11. A)
- Presencia de turbidez. (Figura 11 B)
- Formación de sedimento. (Figura 11 C)
- Formación de velo (Figura 11 D1: Velo superficial; 11 D2: Velo intermedio).

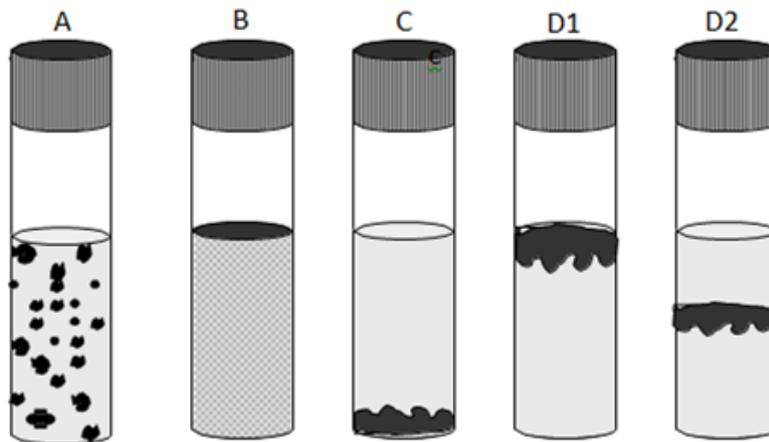


Figura 11: Desarrollo microbiano en medio líquido

### Evaluación en medios sólidos

Se efectúa mediante un examen macro y microscópico:

- Características **macroscópicas** de las colonias.

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

Se deben considerar los siguientes aspectos (Tabla 1):

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

Pequeñas (menor de 1 mm), por Ej. Estreptococos. Medianas y grandes (varios mm), por Ej. Estafilococos o *Salmonella*.

**Forma:** Depende de su borde y espesor.

**Elevación:** Cuando el espesor es mucho mayor en el centro y disminuye uniformemente hacia el borde se dice que la colonia es elevada, siendo entonces convexa en mayor o menor grado, en ocasiones tanto, que casi tiene forma hemisférica. Al corte transversal pueden presentar un aspecto plano o elevado en mayor o menor grado, pudiendo ser: mamelonada, crateriforme, etc.

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

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

**Superficie de crecimiento:** Puede ser uniformemente lisa o estriada.

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

**Consistencia o textura:** Van desde las colonias secas y friables, hasta las viscosas.

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

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias se realiza usualmente mediante el examen visual del desarrollo en la superficie de las placas de agar (Tabla 1).

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

Durante el examen las placas se deben inclinar en distintas direcciones con iluminación brillante directa, de modo que la luz sea reflejada desde diversos ángulos. Algunos microbiólogos

utilizan una lupa o un microscopio estereoscópico para ayudarse en la detección de colonias minúsculas y observar mejor sus características. Las placas de agar sangre se deben examinar también a trasluz, empleando iluminación brillante, a fin de detectar reacciones hemolíticas en el agar.

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

Tabla 1. Características de las colonias usadas en la identificación de

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

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la siembra de microorganismos aerobios con diferentes técnicas, con el propósito de observar y registrar las características macroscópicas de las colonias bacterianas.

### ACTIVIDAD N°1: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICAS DE LAS MUESTRAS.

Observe y registre los tipos de muestras en estudio.

### ACTIVIDAD N°2: SIEMBRA PARA AISLAMIENTO

- 1- Sembrar para aislamiento el material biológico en estudio.
- 2- Incubar a 35-37°C, durante 18-24 h.
- 3- Observar las características macroscópicas de las UFC. Registrar

### ACTIVIDAD N°3: SIEMBRA PARA SUBCULTIVO

- 1- Sembrar para subcultivo en estrías en tubo, a partir de las UFC. Para su tipificación posterior.
- 2- Incubar a 35-37°C, durante 18-24 h.
- 3- Registrar

## CUESTIONARIO GUÍA

Utilizar la bibliografía de consulta y responder:

1. Observar el audiovisual “Siembra y Aislamiento” disponible en el aula virtual y responder:
  - a) ¿Qué elementos de siembra y cultivo reconoce en el video?
  - b) ¿Bajo qué condiciones de esterilidad se trabaja?
  - c) ¿Qué tipos de siembras se desarrollan en el vídeo? ¿Qué importancia tiene la misma?
  - d) ¿Qué secuencia de pasos sigue la siembra en el vídeo?
  - e) El término inóculo ¿A qué hace referencia? ¿Cómo se toma el inóculo en el vídeo?
  - f) ¿Cuáles son los parámetros físico químicos de incubación de los cultivos microbianos?
  - g) Después de la incubación ¿Qué resultados macroscópicos se observan?
2. ¿A que hace referencia el término UFC y en que consiste su importancia?
3. ¿Cuáles de las características macroscópicas relevantes que se observan en las colonias bacterianas?
4. ¿Qué otro examen además del microscópico se debe realizar a las colonias para su identificación?

## **REFERENCIAS**

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.

Cabello, R. R. (2005). Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana.

Madigan, M.T.; Martinko, J.N.; Parker, J. y Pearson. Brock (2013). Biología de los microorganismos. 10° Ed. Madrid. Ed. Pearson - Prentice-Hall.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2006). Manual of clinical microbiology: Volume 2 (No. Ed. 9). ASM press.

Slonczewski, J. L., & Foster, J. W. (2013). Microbiology: An evolving science: Third international student edition. WW Norton & Company.

## TRABAJO PRÁCTICO N°6

### SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

#### OBJETIVOS

- Realizar siembra de muestras clínicas en medios sólidos y líquidos.
- Adquirir habilidades prácticas para la utilización de diferentes atmósferas (aeróbica, microaerófila o anaeróbica) en un cultivo microbiano y comparar sus resultados.
- Analizar ventajas y desventajas del uso de la jarra GasPack.

#### INTRODUCCIÓN

Los organismos anaerobios son aquellos que no utilizan oxígeno (O<sub>2</sub>) en su metabolismo. En general, hay dos tipos de organismos anaerobios, por un lado, están los que utilizan la **respiración anaerobia**, es decir que usan una cadena de transporte de electrones en su metabolismo y, por otro lado, **los fermentativos** que dependen de la fermentación para la obtención de energía (Brock *et al.*, 2003).

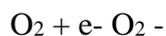
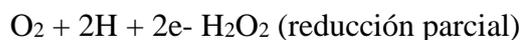
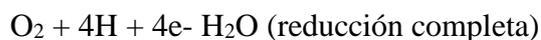
En la respiración anaeróbica existe una cadena de transporte de electrones análoga a la de la respiración aeróbica, pero el aceptor final de electrones no es el oxígeno sino otra molécula, generalmente inorgánica (por ejemplo, sulfato, carbonato, entre otras).

La mayoría de los organismos anaerobios de interés clínico, utilizan la fermentación para obtener energía química. Existen diferentes tipos de fermentación en función de la vía metabólica utilizada. Así, se denomina fermentación alcohólica a aquella en la que se genera etanol, fermentación láctica a la que genera ácido láctico, fermentación ácido-mixta a la que produce ácido láctico, etanol y ácido propiónico y fermentación butírica a la que genera el ácido butírico.

Si bien el O<sub>2</sub> es potencialmente tóxico para cualquier forma de vida, los anaerobios son intolerantes, aunque en diferentes grados. Existe un espectro que va desde los extremadamente intolerantes hasta los aerotolerantes moderados, los cuales pueden sobrevivir a la presencia de O<sub>2</sub> durante breves períodos.

Varias son las causas de la toxicidad del oxígeno. En primer lugar, el O<sub>2</sub> es un poderoso oxidante, es decir, un ávido receptor de electrones, por lo tanto, su presencia en solución es incompatible con potenciales redox bajos. En esta situación el flujo de electrones se ve interferido por un receptor extraño al usual de los microorganismos provocando *shunts* letales. En segundo lugar, el O<sub>2</sub> puede interactuar directamente con enzimas o cofactores causando inactivaciones irreversibles. En tercer lugar y aparentemente, la causa más importante de la

toxicidad se atribuye a la producción de sustancias tóxicas derivadas de la reducción parcial de la molécula O<sub>2</sub>. Simplificando se pueden dar las siguientes reacciones químicas:



La formación de peróxidos de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puede ser catalizada por varias enzimas y su letalidad para las bacterias está fehacientemente comprobada. Por otra parte, el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es altamente tóxico por su participación en la producción de hidroxilos libres (HO<sup>-</sup>) agentes letales para los microorganismos. Aquellos anaerobios aerotolerantes poseen enzimas como catalasas y peroxidasas que descomponen los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O + O; otros poseen superóxido-dismutasas (SOD) que actúan eliminando los O<sub>2</sub><sup>-</sup>; más aún las SOD han sido postuladas como factores de virulencia en los anaerobios ya que estas enzimas permitirían la sobrevivencia de las bacterias en tejidos oxigenados hasta que el consumo de O<sub>2</sub> creará el ambiente adecuado para la multiplicación y desarrollo.

Basándose en los requerimientos de O<sub>2</sub>, las bacterias pueden dividirse en:

**ANAEROBIOS OBLIGADOS:** Crecen sólo en condiciones de alta densidad reductora. Incapaces de utilizar O<sub>2</sub>, el cual les resulta tóxico como *Clostridium botulinum*

**ANAEROBIOS AEROTOLERANTES:** Crecen mejor en ausencia de O<sub>2</sub>, dado que no es tóxico para estos microorganismos, lo que no implica su muerte solamente enlentece su desarrollo, por ejemplo *Clostridium histolyticum*.

**ANAEROBIOS FACULTATIVOS:** Son capaces de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Ejemplo *Enterobacteriaceae*.

**AEROBIOS OBLIGADOS:** Requieren O<sub>2</sub> para su crecimiento, como en *Pseudomonas* spp.

**MICROAEROFILO:** Crecen mejor con bajas tensiones de O<sub>2</sub> y son inhibidos por altas tensiones de O<sub>2</sub>. Por ejemplo los estreptococos.

**CAPNOFILOS:** Requieren una tensión de CO<sub>2</sub> aumentada en lugar de una tensión de O<sub>2</sub> disminuida. Ej. *Brucella* y *Campylobacter*.

En los anaerobios obligados y en los aerotolerantes, el metabolismo es estrictamente fermentativo. Sin embargo, los anaerobios facultativos emplean un modo respiratorio de

metabolismo, cuando disponen de O<sub>2</sub>, pero en su ausencia se produce fermentación. El requerimiento de una tensión de O<sub>2</sub> reducida, en los microaerófilos, es indicador de la presencia de enzimas que son inactivadas bajo condiciones fuertemente oxidantes.

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

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

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

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

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

**Medios líquidos (sólo para hemocultivos):** Existen varios medios comercialmente disponibles. Algunos contienen *sodium polyanetol sulfonate* (SPS) el cual estimula el desarrollo de los anaerobios, aunque al parecer sería inhibidor para *Peptococcus anaerobius*. Se trata de frascos de 100 mL, al vacío, con el agregado de CO<sub>2</sub>, una base nutritiva (digerido trípico de soja o peptonas) y un agente reductor (thiol o thioglicolato). Los frascos se examinan diariamente buscando turbidez, hemólisis o gas. Se consideran negativos definitivamente a los 10 días de incubación. En determinados casos se sugiere realizar un subcultivo final.

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

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

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

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

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

El metabolismo anaerobio es mucho menos eficiente que el aerobio para obtener energía, por tanto, los medios de cultivo tienden a ser mucho más ricos que los de uso común para aerobios y facultativos. Además, se requiere una incubación más prolongada, 24 a 48 horas para el aislamiento general.

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

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

**A) CALOR:** Se debe realizar siempre esta operación con todos los medios de cultivo antes de la siembra para anaerobios. Como el O<sub>2</sub> es menos soluble en agua caliente que en fría, se colocan los tubos con medio de cultivo en un baño de agua hirviendo durante 15 a 20 minutos y luego se introducen en agua fría rápidamente sin agitar. De esta manera se elimina el O<sub>2</sub> de los medios de cultivo.

**B) SISTEMA GASPAK:** (Figura 1) es el mejor método para el cultivo de bacterias anaeróbicas. Permite utilizar medios líquidos o sólidos en profundidad o superficie en tubos o en cajas de Petri. A diferencia de otras jarras, no tiene conexiones externas. Se utiliza un sobre descartable para la generación de hidrógeno y de anhídrido carbónico, eliminando de esta manera la necesidad de bombas de vacío, tanques de gases, manómetros, etc. Se emplea un catalizador de paladio a temperatura ambiente, eliminando el uso de conexiones eléctricas para calentar el catalizador.

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



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



Figura 1: Sistema GasPak

### Técnica

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

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

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

El indicador a las pocas horas se torna incoloro.

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

**Cierre de parafina, vaselina o agar:** Los tubos conteniendo medio líquido estéril, después de sembrados, se cubren con una capa líquida de vaselina o parafina estéril.

En los medios sólidos, la difusión del O<sub>2</sub> se efectúa en las capas superiores, en cambio la parte inferior, se considera casi anaeróbica. Por lo que se aconseja depositar el inóculo en el fondo del tubo con una pipeta Pasteur y luego adicionarle 15 a 20 mL del medio de cultivo sólidos, previamente fundido y enfriado a 45- 50 °C.

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

## **RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

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

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

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

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

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

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

**D) HISOPADO:** no recomendado. Este, se prepara en un tubo anaeróbico y luego se introducirá (ya con la muestra) en un medio de transporte anaeróbico: ejemplo medio de transporte Cary Blair.

Si hay excesiva exposición de los gérmenes al O<sub>2</sub>, se deben procesar las muestras dentro de las 2 horas de obtenidas.

## **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

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

**B) EXAMEN MICROSCÓPICO:** Preparar un extendido para realizar coloración de Gram y la observación microscópica con objetivo de inmersión.

**C) SIEMBRA Y AISLAMIENTO:** Pueden emplearse medios líquidos y sólidos.

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

Una de las desventajas más importantes, es que no es factible la determinación cuantitativa. Estos solo se utilizan como auxiliares de otros medios, por ejemplo, para reactivación de esporas. Ejemplos: caldo sangre para anaerobiosis, caldo ICC, suplementado con extracto de levaduras, caldo thiol, caldo carne suplementado, entre otros.

**2) Medios Sólidos:** Tal como se explicó anteriormente, deben ser más ricos que los medios de uso frecuente para aerobios o facultativos. Por ejemplo, el Agar sangre para anaerobios, cuyo agar base puede ser agar Brucella o Agar ICC complementado con hemina y extracto de levadura, al cual se le agrega sangre animal normal (5 %), vitamina K1 (10 mg/l), extracto de levadura (0,5 %) y cisteína (0,05 %). Si además se le adiciona un aminoglucósido, se inhibe el desarrollo de facultativos.

No son convenientes placas de agar T.S.A., I.C.C. sin suplementos. Se puede utilizar también agar Mc Conkey, Agar Base Columbia (con colistina, ac. nalidíxico), agar sangre alcohol feniletílico anaerobio, etc.

**Recordar, que deben ser medios de reciente preparación, o colocarlos en un baño de agua hirviente durante 15 a 20 minutos y luego introducirlos en agua fría rápidamente al momento de utilizarlos.**

## IDENTIFICACIÓN

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

Los anaerobios se presentan corrientemente en cultivos mixtos con otras especies anaerobias,

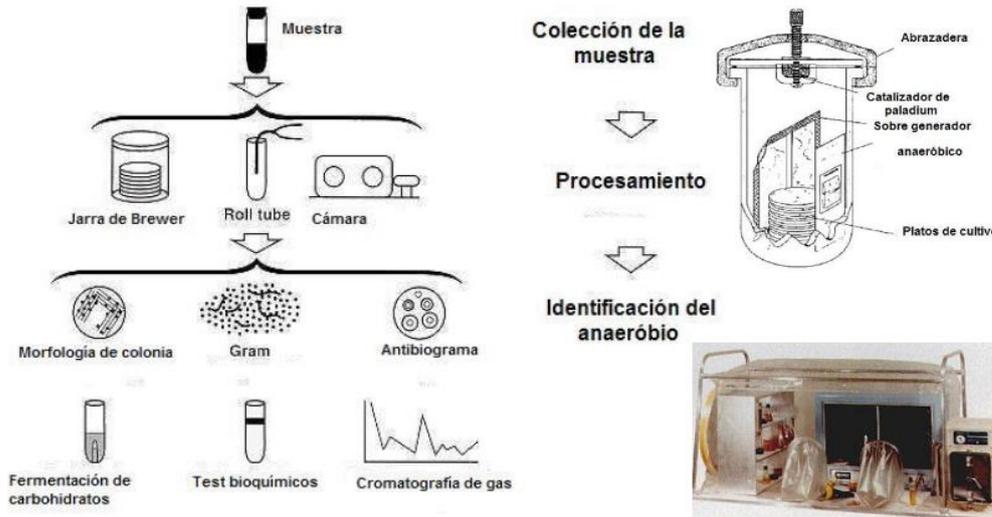


Figura 2: Procesamiento de una muestra para la búsqueda de microorganismos anaerobios

microaerófilas o facultativas. Los pasos para su identificación son:

### 1. Observación macroscópica (Tabla 1)

Tabla 1: Técnicas para registrar características macroscópicas

Registrar	Realizar
Morfología de colonias	Gram
Pigmento	Indol
Hemólisis	Catalasa
Fluorescencia	Test de NO <sub>3</sub>

### 2. Observación microscópica

La tinción de Gram, permite observar la morfología de las células vegetativas y su disposición. La presencia o ausencia de esporos y movilidad son puntos claves en la clasificación e identificación de las bacterias anaerobias.

### 3. Características bioquímicas

El estudio de la fermentación de azúcares y de los productos finales del metabolismo pueden agruparse en: ácidos grasos volátiles y alcoholes, metabolitos no volátiles, ácido fórmico, producción de hidrógeno. Para evaluar e interpretar (Tabla 2) la presencia de estos metabolitos se realizan las siguientes pruebas:

- Cromatografía gas-líquida.
- Reacciones en agar yema de huevo (lecitinasa, lipasa, proteólisis).
- Producción de Indol, H<sub>2</sub>S, ureasa.
- Hidrólisis de esculina y almidón.
- Fermentación de Hidratos de Carbono (glucosa, manitol, lactosa).
- Reducción de Nitrato.
- Acción sobre la leche, gelatina.
- Crecimiento en presencia de 20% de bilis.
- Catalasa.

**Tabla 2: Identificación presuntiva de anaerobios (Lopardo, 2015).**

Especie	Gram	KAN	VAN	COL	Bilis	Indol	Pig	NIT	Urea
<b>Grupo <i>B. fragilis</i></b>	B	R	R	R	R	V	-	-	-
<i>Prevotella</i>	CB	R	R	R/S	S	V	+	-	-
<i>Porph.</i>	CB	R	S	R	S	+	+	-	-
<i>Fuso.</i>	B*	S	R	S	V	V	-	-	-
<b>Otros BGN</b>	B	S	R	S	V	-	-	V	V
<b>Cocos -</b>	C	S	R	S	S	-	-	+	-
<b>Cocos +</b>	C	V	S	R	NA	V	-	-	-
<i>Clostridium</i>	B	S	S	R	NA	V	-	V	V
<b>Otros BGP</b>	B	S	S	R	NA	V	-	V	V

KAN: kanamicina 1000 µg, VAN: vancomicina 5 µg, COL: colistina 10 µg, Pig: pigmento, NIT: reducción de nitratos, Mov: movilidad, Porph: *Porphyromonas*, Fuso: *Fusobacterium*, C : cocos, CB: cocobacilos, B: bacilos, B\*: bacilos fusiformes o pleomorfos. V: variable, NA: no aplicable

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a realizar técnicas de siembra destinado para aislamiento de microorganismos anaerobios, microaerófilos y/o capnófilos.

### ACTIVIDAD N°1: PREPARACION AGAR SANGRE

Inocular el 5% de sangre v/v a la base de agar base fundido y enfriado a 45°C. Distribuir en placas. Esperar que solidifique y secar en estufa.

### ACTIVIDAD N°2: PREPARACION AGAR CHOCOLATE

Inocular el 5% de sangre v/v a la base de agar base fundido y llevar nuevamente a baño María hasta la hemólisis de los eritrocitos. Distribuir en placas. Esperar que solidifique y secar en estufa.

### ACTIVIDAD N°3: SIEMBRA PARA AISLAMIENTO

1. Observar y registrar las características de las muestras.
2. Sembrar para aislamiento en las placas de agar sangre y agar chocolate.
3. Generar las condiciones de microaerobiosis mediante la combustión del oxígeno disponible dentro del recipiente con tapa.
4. Incubar de 48 a 72 horas.
5. Analizar y caracterizar macroscópicamente las UFC colonias. Registrar el tipo de hemólisis.
6. Efectuar tipificación fenotípica e informar.

## CUESTIONARIO GUÍA

**Utilizar la bibliografía de consulta y responder:**

1. Mencione ventajas y desventajas de utilizar el sistema GasPak. Esquematizar.
2. Discutir la fundamentación del proceso de incubación y los resultados esperados en la actividad práctica realizada en el laboratorio.
3. ¿Cuáles son los medios de cultivos más utilizados para los microorganismos anaerobios?
4. ¿Cuáles son las precauciones que se deben tener en cuenta al momento de tomar la muestra y transportarla hasta el laboratorio?
5. Seleccionar 2 ejemplos de bacterias anaerobias y describir su importancia clínica.

6. Realizar un cuadro donde compare siembra de microorganismos aerobios y anaerobios, teniendo en cuenta los siguientes aspectos: recolección de muestra, medios de cultivos, siembra, incubación, observación macroscópica y microscópica.

7. ¿Cómo se consigue un ambiente para la incubación de microorganismos Microaerófilos y Capnófilos?

### REFERENCIAS

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.

Dowell, V. R. (1974). Laboratory methods in anaerobic bacteriology: CDC laboratory manual. Center for Disease Control.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2006). Manual of clinical microbiology: Volume 2 (No. Ed. 9). ASM press.

Willis, A. T. (2014). Anaerobic bacteriology: clinical and laboratory practice. Butterworth-Heinemann.

Lopardo HA, Gobet LM, Viegas Caetano JA, Moviglia AM, Vigliarolo LO, Suárez MC. Introducción a la microbiología clínica. Colección Libros de Cátedra EDULP 2015 ISBN 978-950-34-1313-5. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52389>

## TRABAJO PRÁCTICO N° 7: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

### OBJETIVOS

- Conocer el fundamento y la interpretación de las pruebas bioquímicas para bacterias aerobias y anaerobias facultativas.
- Aproximar la tipificación fenotípica de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, mediante la realización de pruebas bioquímicas.

### INTRODUCCIÓN

Existen diversos métodos de identificación bacteriana, los fenotípicos convencionales, que se describen en esta guía de trabajos prácticos, los métodos fenotípicos automatizados (equipos como VITEK-2 compact<sup>®</sup>), los métodos moleculares basados en reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de ácidos nucleicos como RNA ribosomal y más recientemente métodos proteómicos denominados espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana entre otros.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana comienzan con la observación de las **características macroscópicas** de las colonias y la morfología y agrupación en la **coloración de Gram**. Posteriormente, la caracterización final en género y especie de un aislamiento bacteriano desconocido, se logra realizando diversas **pruebas bioquímicas** o métodos fenotípicos. Éstas consisten en la detección de ciertos sistemas enzimáticos exclusivos y/o productos formados por su metabolismo que sirven como marcadores o como taxones para su identificación.

En el laboratorio estos sistemas enzimáticos se pueden detectar inoculando una colonia aislada (cultivo puro) a una serie de medios cultivos que contienen sustratos específicos e indicadores químicos que detectan cambios de pH o la presencia de subproductos específicos.

El microbiólogo debe seleccionar el conjunto apropiado de pruebas bioquímicas requeridas para la identificación de cada grupo de bacterias. Se llevará a cabo una prueba u otra dependiendo del microorganismo a estudiar. Las pruebas son dicotómicas y se evalúan en función de los resultados obtenidos.

Se debe realizar un conjunto de pruebas bioquímicas, las cuales son **orientativas** hacia la tipificación bacteriana. Se describen a continuación algunas de ellas.

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA BACILOS GRAM (-)

En la Tabla 1 se detallan las pruebas bioquímicas que deben realizarse para los aislamientos

identificados como bacilos Gram negativos mediante observación al microscopio óptico. Es fundamental también considerar el origen de la muestra de la cual se aisló la bacteria, ya que este factor puede influir en los resultados y la interpretación de las pruebas.

**Tabla 1: Pruebas bioquímicas para bacilos Gram (-)**

### OXIDASA

**Negativo**

**Positivo**

#### UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA (TSI: *Triple Sugar Iron*)

FERMENTADORES (TSI+)	NO FERMENTADORES (TSI-)
Ej. <i>Enterobacteriaceae</i>	Ej. <i>Pseudomonas</i> , otros bacilos G (-)
Pruebas de identificación:	Pruebas de identificación:
<b>IMViC: Indol - Rojo de metilo</b> <b>Voges - Proskauer - Citrato</b>	Movilidad
DNasa: Descarboxilasa	Indol
Urea de Christensen	Producción de pigmentos
Fenilalanina-Desaminasa	O-F: Oxidación- Fermentación
Fermentación de Hidratos de Carbono	Crecimiento en Mc Conkey
O-F: Oxidación- Fermentación	DNasa: Descarboxilasa, etc.
ONPG	

NOTA: Las pruebas registradas en negrita son descritas en la presente guía. Las pruebas en verde se realizarán en el trabajo práctico.

### PRUEBA DE LA OXIDASA

Detecta la presencia o ausencia de la enzima **citocromo oxidasa**. Esta enzima pertenece a la cadena respiratoria constituyendo un sistema citocromo oxidasa, la reacción de identificación ocurre cuando se oxida el citocromo por acción del oxígeno molecular (empleado como aceptor de electrones) produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. La prueba de la oxidasa utiliza ciertos colorantes reactivos como, (diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina) que actúa como aceptor artificial de electrones, sustituyendo al oxígeno, cambiando de color.

La prueba se puede realizar por dos métodos:

**Técnica directa en placa:** consiste en añadir directamente 2 ó 3 gotas del reactivo a las colonias bacterianas aisladas que se desarrollan en placas.

**Técnica indirecta en tiras de papel:** Se añaden unas gotas del reactivo, a una tira de papel de filtro y sobre esa zona se extiende con un asa ojal la colonia sospechosa y transcurrido los 10 segundos, se detecta la reacción. (Figura 1).

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

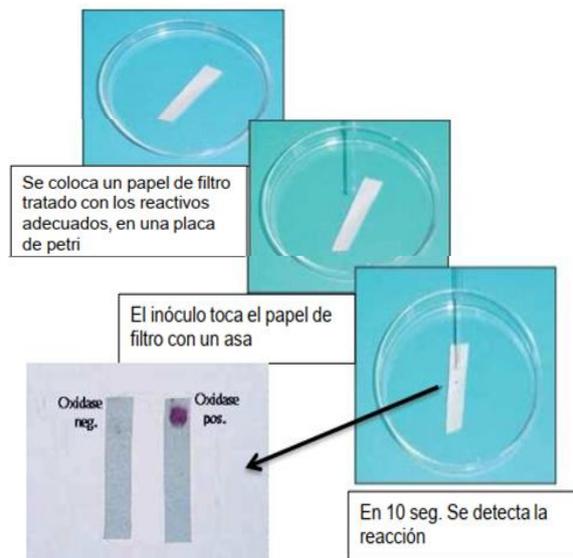


Figura 1: Prueba indirecta de la Oxidasa en tira de papel

### Interpretación

**Oxidasa (+):** intenso color azul/púrpura, en ocasiones fucsia intenso (dependiendo de la marca del reactivo utilizado).

**Oxidasa (-):** incolora

### PRUEBA TSI AGAR

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

El agar TSI es un medio diferencial, con la finalidad de:

- Determinar si las bacterias fermentan los hidratos de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa) produciendo ácido y gas.
- Detectar la producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S)

Es un medio muy rico desde el punto de vista nutritivo porque tienen derivados proteicos y están exentos de inhibidores, lo que permite el desarrollo de la mayoría de las especies bacterianas.

La fermentación de los hidratos de carbono produce ácidos que se detectan por el cambio de color, de rojo a amarillo, del indicador de pH rojo fenol presente en la composición del medio.

### Composición del TSI

Fórmula (en gramos por litro)		Fundamento
Extracto de carne	3.0	Aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano
Pluripeptona	20.0	
Cloruro de sodio	5.0	Mantiene el balance osmótico
Lactosa	10.0	Hidratos de carbono fermentables
Sacarosa	10.0	
Glucosa	1.0	
Sulfato de hierro y amonio	0.2	Detector del H <sub>2</sub> S para producir un precipitado negro insoluble de FeS
Tiosulfato de sodio	0.2	Sustrato para la producción de H <sub>2</sub> S
Rojo fenol	0.025	Indicador de pH
Agar	13.0	Agente solidificante
Agua purificada		Solvente
pH final 7.3 +/- 0.2		

### Procedimiento

1. Se prepara el agar en pico de flauta, esto permite la existencia de dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada, expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción, llamada fondo o profundidad, está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al preparar los medios es importante que el pico y el fondo tengan aproximadamente 3 cm de longitud cada uno, a fin de conservar este efecto de las dos cámaras.
2. La colonia sospechosa en estudio y aislada en una placa de agar, se inocula con un ansa recta en los tubos de TSI atravesando el medio hasta la parte profunda del tubo. Es importante no extender la línea de siembra a más de 3 a 5 mm del fondo del tubo para evitar la entrada de aire en la parte profunda y alterar el medio anaerobio. Luego de retirar el ansa del fondo, se estría en la superficie del pico con un movimiento en zig zag. Se incuba a 35° +/- 2°C durante 18 a 24 h.

Es importante interpretar los resultados dentro del período de incubación de 18 a 24 h. Si se lee antes de las 12 h, puede obtenerse un resultado falsamente positivo de ácido/ácido, debido a que la **glucosa** aún no se ha degradado completamente. Erróneamente se interpreta como que el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y sacarosa. Por otra parte, un tubo de TSI leído después de 24 h puede dar un falso negativo de alcalino/alcalino porque el microorganismo ha usado las peptonas como elementos nutritivos para continuar su reproducción, lo que da un pH alcalino.

Es necesario tener en cuenta que si la generación de **H<sub>2</sub>S** es elevada puede llevar al ennegrecimiento de todo el fondo del medio de cultivo y dificultar la visualización de la acidez producida. Es necesario aclarar que para que se produzca H<sub>2</sub>S debe existir un ambiente ácido, por eso si no se observa se debe considerar igualmente acidez positiva.

### Interpretación

Según el comportamiento de las bacterias que desarrollan en estos medios, se producen distintos tipos de reacciones (Figura 2).

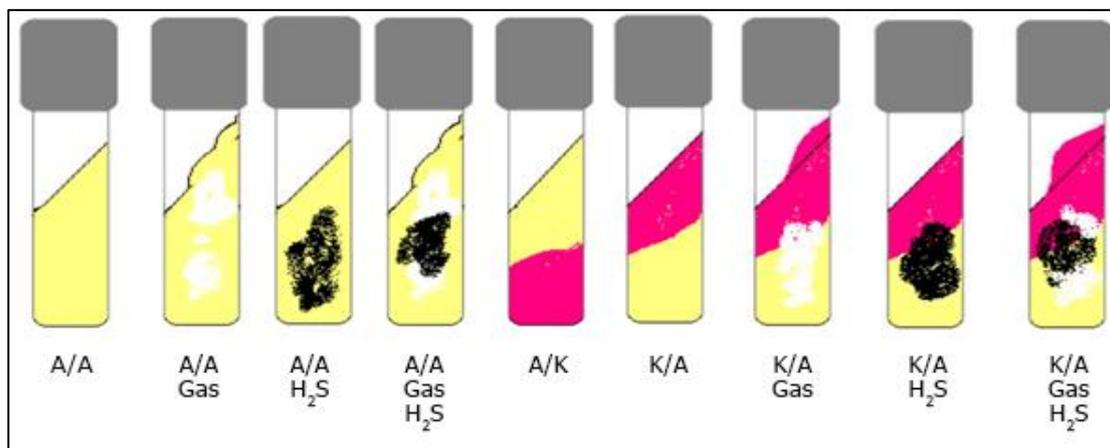


Figura 2: Interpretación de algunos resultados de la prueba TSI

Se analizan los resultados, registrando primero el cambio de reacción del pico de flauta (superficie) y luego el fondo (profundidad) como se indica a continuación (Tabla 2).

**Tabla 2: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba TSI**

Superficie/Profundidad	Producción de gas	Producción de H <sub>2</sub> S	Microorganismos
A/A	Positivo (+)	Negativo (-)	<i>Escherichia coli</i>
A/A	Positivo (+)	Negativo (-)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
K/A	Negativo (-)	Positivo (+)	<i>Proteus mirabilis</i>
K/A	Negativo (-)	Positivo (+)	<i>Salmonella typhimurium</i>
K/A	Negativo (-)	Negativo (-)	<i>Shigella flexneri</i>
K/K	Negativo (-)	Negativo (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**A:** reacción ácida (color amarillo)

**K:** reacción alcalina (color rojo)

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

Ejemplo de bacterias que fermentan glucosa y lactosa (y/o sacarosa): coliformes como *Escherichia coli* y el grupo *Klebsiella-Enterobacter*.

**Fermentación de glucosa solamente (Alcalino/Ácido):** Esta reacción (alcalina/ácida) se da en los microorganismos capaces de fermentar solamente la glucosa; no son fermentadores de lactosa o sacarosa. La zona superior del pico de flauta se acidifica (amarilla) en las primeras horas de desarrollo, lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa. Después de 18 a 24 h 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, este catabolismo de la peptona produce la liberación de amoníaco, dando un pH alcalino con el rojo fenol.

Cuando se observa color amarillo en la capa profunda del medio, se debe a la degradación anaeróbica de la glucosa, que ocurre después de 18 a 24 h de incubación, dando un pH ácido (amarillo) por los productos finales ácidos que se forman. La reacción ácida se mantiene debido

a la tensión de oxígeno más baja.

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

**No fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa:** Esta reacción (todo rojo), se da cuando los microorganismos no fermentan estos azúcares, por lo tanto, no pueden obtener sus nutrientes a partir de los hidratos de carbono y dependen de las peptonas del medio, por lo cual no se forman ácidos y la producción de aminas en el pico, junto con los *buffers* 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*.

Estos microorganismos pueden usar la peptona de manera aeróbica o anaeróbica y producen dos reacciones posibles:

- Alcalina/Alcalina: degradan las peptonas tanto aeróbica como anaeróticamente.
- 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 intenso).

## Gas

El tubo de TSI se observa para determinar si las bacterias presentes pueden producir gas ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) como producto final del metabolismo de los hidratos de carbono. Esta producción de gas se puede evidenciar por la fragmentación o desplazamiento parcial o total del medio o una ligera separación del medio de las paredes del tubo. En determinadas ocasiones se forman burbujas.

## Formación de $\text{H}_2\text{S}$

También puede observarse la producción de ácido sulfhídrico, otra diferenciación que es aportada por los indicadores de  $\text{H}_2\text{S}$  presentes en el medio (el tiosulfato de sodio y el sulfato de hierro y amonio). El tiosulfato de sodio produce el  $\text{H}_2\text{S}$ , éste es un gas incoloro, por ello, es necesario un segundo indicador, fuente de iones  $\text{Fe}^{3+}$ , los cuales se combinan con el  $\text{H}_2\text{S}$  producido y generan sulfuro de hierro de color negro (ennegrecimiento del medio) que indica que el microorganismo es productor de  $\text{H}_2\text{S}$ .

## PRUEBA IMViC

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

resultado del test se expresa mediante símbolos (+ o -).

Estas pruebas son (Figura 3):

**I- Indol**

**M – Rojo de Metilo**

**V – Voges Proskauer**

**iC – Citrato**

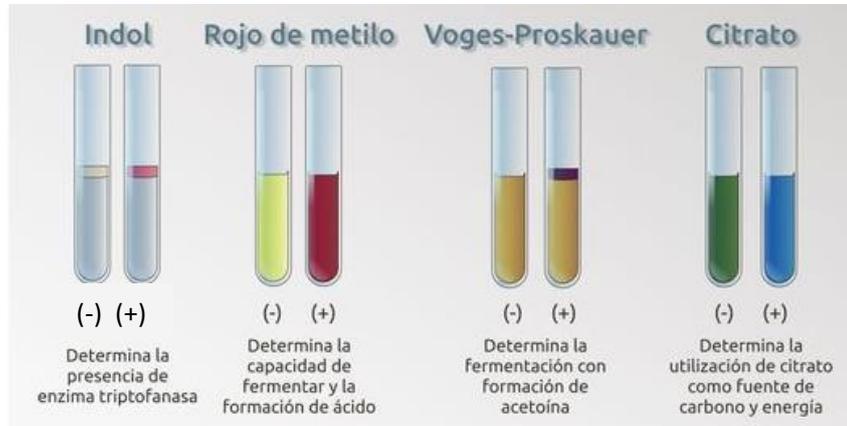


Figura 3: Pruebas de IMViC

- **Prueba Indol**

Detecta a las bacterias que poseen la enzima triptofanasa, las cuales son capaces de degradar el triptófano (incorporado en el medio de cultivo) y producir indol, ácido pirúvico y amoníaco (Figura 4).

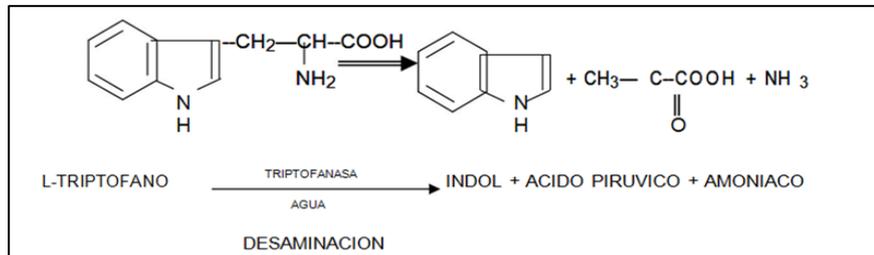


Figura 4: Reacción química metabolismo del aminoácido triptófano

### Procedimiento

1. El microorganismo se inocula con un ansa aguja punzando una vez en el centro del medio de cultivo semisólido con alto contenido de L-triptófano como es el medio **semisólido SIM** (medio que pone en evidencia los derivados del Sulfhídrico -**Indol-M**ovilidad) (Tabla 3).
2. Se incuba a 35° C durante 18 a 24 h.
3. La presencia de indol al cabo de la incubación se revela por el agregado de un reactivo que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (DMABA), denominados reactivos de Ehrlich o de Kovacs.

### Composición del SIM

Fórmula (en gramos por litro)		Fundamento
Tripteína	20.0	Aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de la tripteína y de muchas peptonas.
Peptona	6.1	
Sulfato de hierro y amonio	0.2	A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro.
Tiosulfato de sodio	0.2	
Agar	3.5	Agente solidificante
Agua purificada		Solvente

pH final 7.3 +/- 0.2

### Interpretación

Si la prueba es positiva para la producción de indol, aparece un anillo rojo (fucsia brillante) en la interfase del medio y si resulta negativo no se observan cambios en la coloración (amarillenta) (Figura 5).

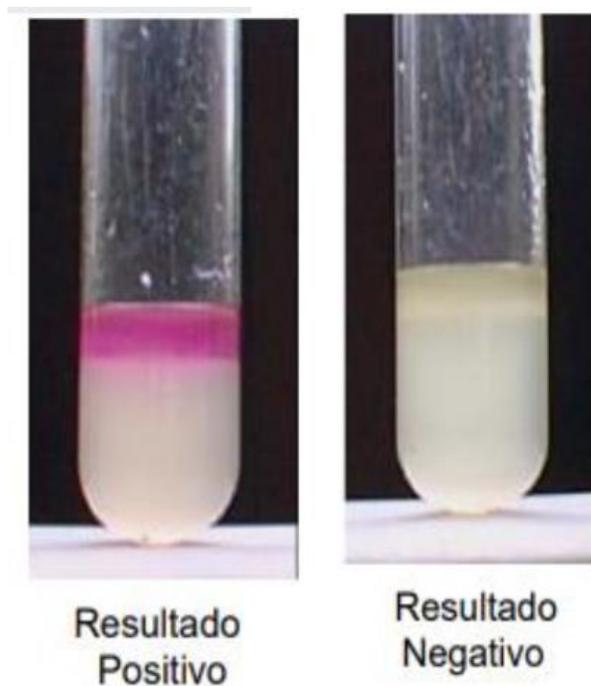


Figura 5: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de indol.

- **Prueba de Movilidad**

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

**Procedimiento**

El microorganismo se inocula con un ansa aguja punzando una vez en el centro del medio de cultivo semisólido de SIM, hasta una profundidad de 2 cm. Se incuba 24- 48 h a 37°C, o bien, a temperatura ambiente según el microorganismo en estudio.

**Interpretación**

Prueba positiva: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra. Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio.

Prueba negativa: crecimiento bacteriano únicamente a lo largo de la línea de siembra del medio (Figura 6).

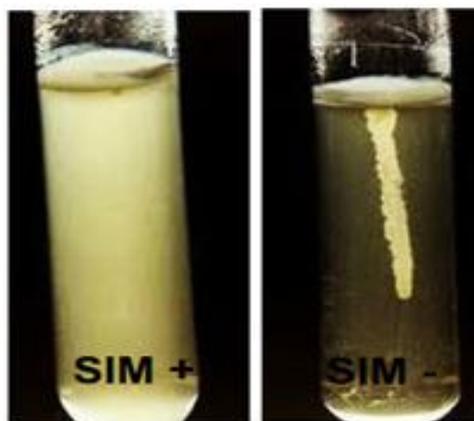


Figura 6: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de Movilidad

- **Prueba de H<sub>2</sub>S**

Se utiliza para determinar si una bacteria puede producir H<sub>2</sub>S a partir de la reducción de compuestos sulfurados, como el tiosulfato o el sulfato

**Procedimiento**

El microorganismo se inocula con un ansa aguja punzando una vez en el centro del medio de cultivo semisólido de SIM, hasta una profundidad de 2 cm. Se incuba 24- 48 h a 37°C.

**Interpretación**

Prueba positiva: Si el medio presenta un color negro o precipitado negro, esto indica que la bacteria ha producido H<sub>2</sub>S.

Prueba negativa: Si no se observa cambio de color o precipitado negro, la bacteria no ha producido H<sub>2</sub>S. (Figura 7).

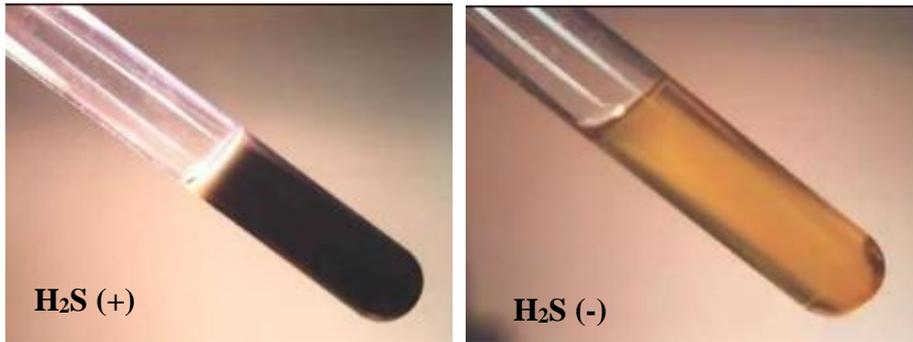


Figura 7: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de H<sub>2</sub>S

Tabla 3: Lectura e interpretación de las pruebas bioquímicas con SIM

Movilidad	Indol	H <sub>2</sub> S	Microorganismo
Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)	<i>Escherichia coli</i>
Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)	<i>Salmonella typhimurium</i>
Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)	<i>Shigella flexneri</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)	<i>Proteus mirabilis</i>

● Prueba Rojo Metilo / Voges Proskauer

Una vez metabolizada la glucosa hasta ácido pirúvico, los microorganismos siguen distintas rutas metabólicas, dando productos variados que se tratan de identificar para caracterizar el género o la especie microbiana correspondiente. Estas son: la vía del Acetilmetilcarbinol (fermentación butanodioica) y la vía de la Fermentación ácida mixta (Figura 8).

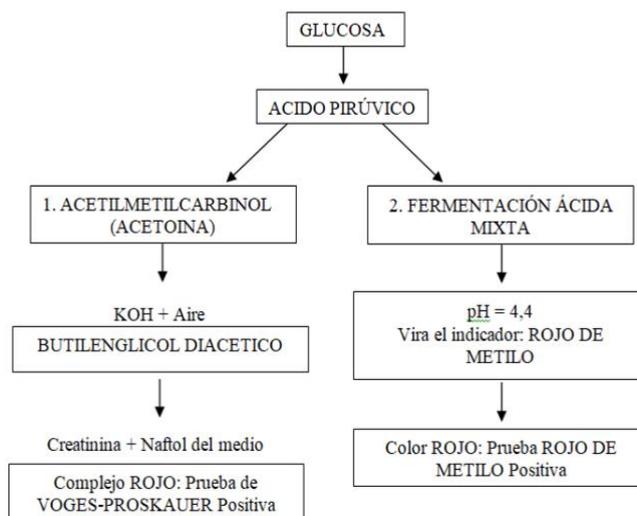


Figura 8: Representación esquemática de las vías metabólicas de la glucosa

### Prueba de Rojo de metilo (RM)

Identifica especies bacterianas que son grandes productores de ácidos orgánicos fuertes (láctico, acético, fórmico) a partir de glucosa, por la vía de fermentación ácida mixta.

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

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

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

### Procedimiento

1. Se inocula un cultivo puro del microorganismo en estudio, utilizando un ansa ojal en tubo que contiene el caldo RM/VP.
2. Se incuba a 35 °C y se determina después de 48 horas (no menos) y hasta 5 días.
3. Finalizado este período, agregar 2 a 5 gotas del indicador de pH rojo de metilo de forma directa.

### Composición del caldo RM/VP

Fórmula (en gramos por litro)		Fundamento
Pluripeptona	7.0	Aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y
Glucosa	5.0	Es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas: ácido mixta o butanodioica. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (láctico, acético, fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol)
Fosfato Dipotásico	5.0	Actúa como un agente tamponador en el medio
Agua purificada		Solvente

pH final 6.9+/- 0.2

### Interpretación

La aparición 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 (-) (Figura 9).



Figura 9: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba RM.

- **Prueba Voges-Proskauer (VP)**

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

### Procedimiento

1. Se inocula un cultivo puro del microorganismo en estudio, utilizando un ansa ojal en tubo que contiene el caldo RM/VP.
2. Se incuba a 35 °C y se determina después de 48 horas (no menos) y hasta 5 días.
3. Finalizado este período, 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 %.
4. Se agita suavemente el tubo para poner en contacto con el oxígeno atmosférico en medio alcalino y se deja reposar entre 10-15 minutos. Observar.

### Interpretación

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

Un color amarillo indica reacción negativa (-) (Figura 10).

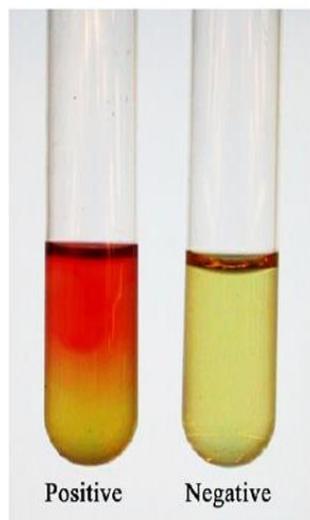


Figura 10: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba VP.

### • Prueba de Citrato

Esta prueba se realiza 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). Este es un medio de cultivo diferencial, tiene como única fuente de carbono el citrato, y como fuente de nitrógeno, sales de amonio, las bacterias que pueden utilizar el citrato, solo pueden incorporar nitrógeno partiendo de dichas sales, lo que alcaliniza el medio, cambiando su color.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Para la realización de esta prueba pueden utilizarse distintos medios que contienen citrato como:

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

**2. Medio Citrato 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.

## Composición del Citrato de Simmons

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Fundamento</b>
Citrato de sodio	2.0	Fuente de carbono para el desarrollo bacteriano
Cloruro de sodio	6.0	Balance osmótico
Fosfato dipotásico	1.0	*Sistema buffer (sales de fosfato)
Fosfato monoamónico	1.0	Fuente de nitrógeno para el desarrollo bacteriano *Sistema buffer (sales de fosfato)
Sulfato de magnesio	0.2	Cofactor enzimático
Azul de bromotimol	0.08	Indicador de pH
Agar	15.0	Agente solidificante
Agua purificada		Solvente
pH final 6.9 +/- 0.2		

## Procedimiento

Se inocula con un ansa aguja un tubo pico de flauta conteniendo citrato de Simmons, estriando la superficie del mismo con un inóculo escaso, tomado de una UFC. Si se usa un inóculo denso puede variar el color del pico afectando su visualización y originar resultados falsos positivos. Cuando se siembra una serie de pruebas bioquímicas a partir del mismo cultivo, se recomienda utilizar primero el citrato, dado que cualquier arrastre de materia orgánica puede originar resultados falsos positivos.

Se incuba a 35 +/- 2 °C durante 24 a 48 horas (hasta 4 días).

## Interpretación

El crecimiento bacteriano acompañado de un intenso color azul en el pico de flauta, indica que la prueba es positiva (el microorganismo utilizó el citrato contenido en el medio). 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. La prueba es negativa cuando hay ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo (Figura 11).



Figura 11: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de Citrato

Color del medio	Crecimiento	Microorganismo
Azul	Positivo (+)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		<i>Salmonella typhimurium</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Verde	Negativo (-)	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella flexneri</i>

Luego de interpretar todos los resultados obtenidos, se identifica el microorganismo leyendo la Tabla 5.

**Tabla 5: Interpretación global de las pruebas de identificación de bacilos Gram (-)**

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

A: Ácido V: Variable, Según las especies.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA COCOS GRAM POSITIVOS (+)

En la tabla 6 se presentan las pruebas bioquímicas que se deben realizar a los aislamientos que sean identificados como cocos Gram positivos en la observación al microscopio óptico.

**Tabla 6: Pruebas bioquímicas utilizadas para los cocos Gram (+) más comunes.**

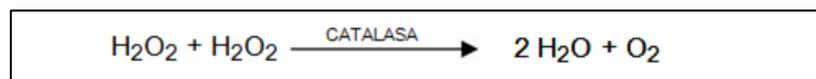
### CATALASA

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

NOTA: Las pruebas registradas en negrita son descritas en la presente guía. Las pruebas en verde se realizarán en el trabajo práctico.

### ● PRUEBA DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno desprendiendo oxígeno (Figura 12), la poseen muchos microorganismos aerobios y anaerobios facultativos excepto los estreptococos.



**Figura 12:** Reacción química de la Catalasa

Esta prueba se lleva a cabo en portaobjetos o en tubos y es comúnmente utilizada para diferenciar las familias Staphylococcaceae (cat+) de Streptococcaceae y Enterococcaceae (cat -).

También se utiliza para diferenciar especies de bacilos Gram (+) y micobacterias. En las micobacterias esta prueba se puede realizar de forma cuantitativa o semicuantitativa.

### Procedimiento

- **Prueba en portaobjetos**

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

2. Añadir 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % (10 Vol).

No invertir el orden del procedimiento (del microorganismo al reactivo) ya que pueden ocurrir resultados falsos positivos. No es necesario mezclar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el cultivo.

- **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 de agar o pico de flauta.

### Interpretación

La rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva (Figura 13).

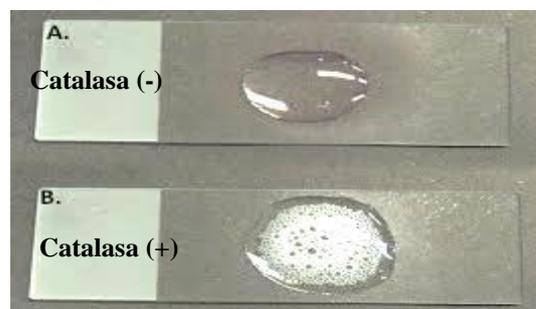


Figura 13: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de Catalasa

- **PRUEBA DE LA COAGULASA**

Se utiliza para identificar especies bacterianas que contienen la enzima coagulasa. Esta puede estar presente en dos formas, **fija o ligada** y **libre** cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas.

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

### Procedimiento

1. Sobre un portaobjeto, se agregan: una ansada de la cepa *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) como control, y otra ansada con la colonia sospechosa. Se parten siempre de cultivos frescos y colonias aisladas.

2. Se agrega una gota de plasma y se mezcla suavemente.

### Interpretación

En caso positivo, se observa la inmediata formación de un precipitado macroscópico en forma de aglutinados blancos en el control y en el problema. La prueba es negativa si se observa aglutinado en el control y no hay aglutinación en el problema (Figura 14).

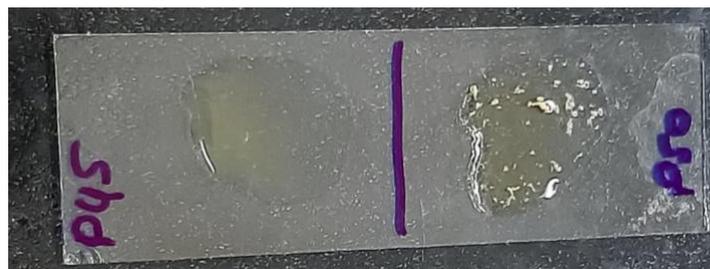


Figura 14: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de coagulasa fija. Izquierda: coagulasa negativa. Derecha: coagulasa positiva.

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

### Procedimiento

Se lleva a cabo sembrando en 0,5 mL de plasma humano o de conejo con una ansada que contenga abundante material de colonia sospechosa o con 0,3 mL de suspensión bacteriana en estudio realizada en solución fisiológica.

Se agita el tubo suavemente para lograr la suspensión y se coloca en baño de agua a 37°C o se deja incubando en estufa. El mismo procedimiento se realiza con la cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) como control positivo de la prueba.

### Interpretación

La lectura de ambos tubos se realiza cada 30 minutos en el lapso de 1 a 4 h, inclinando suavemente los tubos. Las cepas coagulasa (+) producen un coágulo visible en ese tiempo. Caso contrario dejar 24 h y leer. Las cepas coagulasa (-) no producen coágulo (Figura 15).

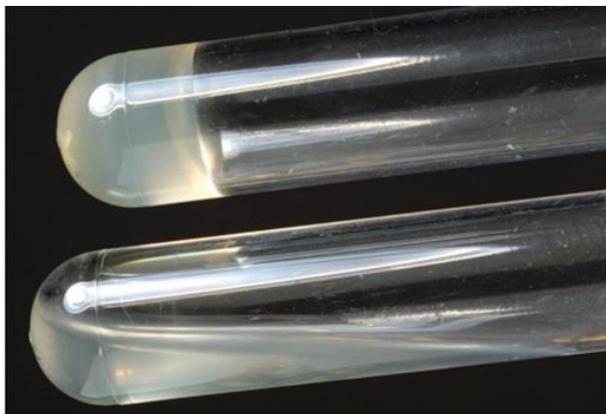


Figura 15: Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de coagulasa libre. Arriba: resultado positivo. Abajo: resultado negativo.

### • PRUEBA VOGES-PROSKAUER (VP)

Prueba descrita en el apartado de Pruebas bioquímicas para Bacilos Gram negativos (IMViC).

### Procedimiento

1. Se procede de igual forma que en el IMViC.
2. Se incuba a 35 °C y se revela según lo descrito, después de 24/48 horas.

### Interpretación

El desarrollo de un color rojo indica reacción positiva (+). Un color amarillo indica reacción negativa (-) al igual que en las pruebas IMViC (Figura 9).

## **METODOLOGÍA AUTOMATIZADA DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

Existen en el mercado galerías multi-pruebas cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. Algunos de los sistemas en paneles comerciales más disponibles en el mercado: MicroScan, Vitek (Figura 16), Phoenix, entre otros. Estos sofisticados equipos pueden realizar la tipificación de los microorganismos presentes en una dilución de concentración conocida. También permiten realizar otro tipo de pruebas como las de resistencia a los antimicrobianos.



Figura 16: Vitek 2 Compact. Sistema de tipificación bacteriana automatizada.

## **MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Por lo tanto, la secuenciación de dicho gen, conservado en el tiempo por cada especie, sirve para la identificación genética de las especies de bacterias.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a realizar la tipificación fenotípica de un bacilo Gram (-) y un coco Gram (+).

### ACTIVIDAD N°1: TIPIFICACIÓN DE BACILOS GRAM (-)

Realizar la tipificación fenotípica correspondiente a UFC provenientes del TP siembra y aislamiento y propagadas en medios mínimos.

#### 1. Prueba de la oxidasa. Técnica directa en tiras de papel

- a. Colocar una tira de papel de filtro en una placa de Petri.
- b. Añadir unas gotas de reactivo de Kovacs
- c. Extender sobre el papel de filtro con el reactivo utilizando un ansa de plástico o palillo de madera la UFC en estudio.
- d. Esperar 10 segundos y observar la reacción que se evidencia por el cambio de color. Leer, registrar e interpretar resultados.
- e. Descartar el material biopatológico en hipoclorito de sodio al 5 %

#### 2. Prueba TSI.

- a. Rotular e inocular en profundidad con un ansa aguja y luego en estrías sobre el pico de flauta del TSI.
- b. Incubar de 18 a 24h.
- c. Leer, registrar e interpretar resultados.

#### 3. Pruebas IMViC: Citrato

- a. Rotular e inocular con ansa ojal el pico de flauta del citrato, estriando la superficie con un inóculo escaso.
- b. Incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas (hasta 4 días).
- c. Leer, registrar e interpretar resultados.

#### 4. Pruebas IMViC: Indol y movilidad

- a. Rotular e inocular con un ansa aguja el centro del tubo con medio SIM, la punción debe tener unos 2 cm de profundidad aproximadamente.
- b. Incubar a 35°C durante 18-24 horas.
- c. Leer registrar e interpretar resultado: presencia / ausencia de movilidad.
- d. Agregar 3 a 5 gotas del reactivo de Ehrlich. Esperar unos segundos.
- e. Leer y registrar e interpretar resultado: Indol.

### 5. Pruebas IMViC: Rojo Metilo

- a. Rotular un tubo con caldo RM-VP e inocular con un ansa ojal el microorganismo en estudio.
  - b. Incubar a 35 °C durante 48 a 120 h.
  - c. Revelar: Agregando 2 a 5 gotas del indicador de pH rojo de metilo directamente.
6. Leer, registrar e interpretar resultados.

### 7. Pruebas de IMViC: Voges Proskauer

- a. Rotular un tubo con caldo RM-VP e inocular con un ansa ojal el microorganismo en estudio.
- b. Incubar a 35 °C durante 24 a 48 h.
- c. Revelar, agregando 0,6 de  $\alpha$  naftol y luego 02 de HOK al 40%.
- d. Leer, registrar e interpretar resultados.

## ACTIVIDAD N°2: TIPIFICACIÓN DE COCOS GRAM (+)

Realizar la tipificación fenotípica correspondiente a UFC provenientes del TP siembra y aislamiento y propagadas en medios mínimos.

### 1. Prueba TSI.

- a. Rotular e inocular en profundidad con un ansa aguja en profundidad y luego en estrías sobre el pico de flauta del medio TSI.
- b. Incubar por 24h.
- c. Leer, interpretar y registrar los resultados.

### 2. Prueba de la catalasa en portaobjetos:

- a. Rotular el extremo de un portaobjeto limpio y extender con un ansa la UFC en estudio.
- b. Añadir 1 ó 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno al 3 %).
- c. Observar la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas).
- d. Leer, registrar e interpretar resultado.
- e. Descartar el material biopatológico en hipoclorito de sodio al 5 %.

### 3. A. Prueba de coagulasa en portaobjetos:

- a. Rotular el extremo de un portaobjeto limpio y colocar 2 gotas de plasma fresco
- b. Extender con un ansa ojal la UFC en estudio, mezclar suavemente.
- c. Leer, interpretar y registrar los resultados.
- d. Descartar el material biopatológico en hipoclorito de sodio al 5 %.

### 3. B. Prueba de la coagulasa en tubo:

- a. Rotular un tubo tipo hemólisis.

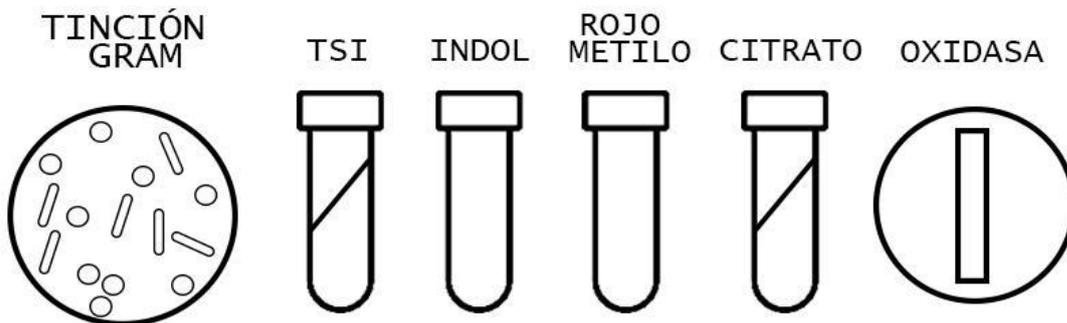
- b. Colocar 0,5 mL de plasma humano o de conejo.
- c. Inocular con un ansa ojal de la UFC en estudio.
- d. Agitar el tubo suavemente para homogeneizar, incubar a 37 °C.
- e. Leer, interpretar y registrar los resultados.

### CUESTIONARIO GUÍA

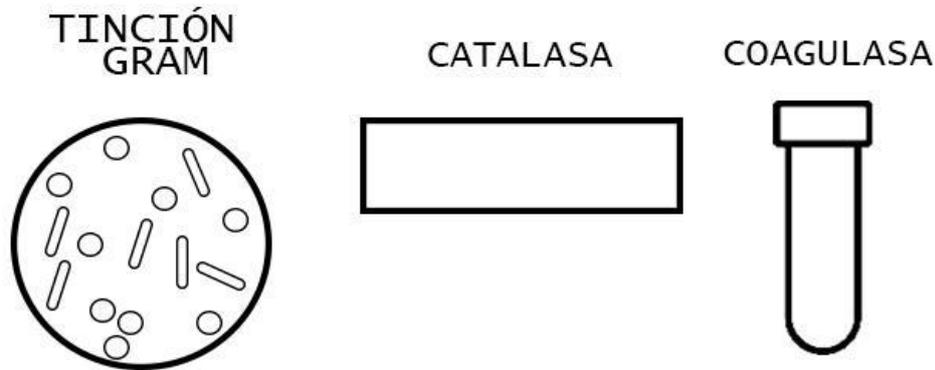
#### Utilizar la bibliografía de consulta y responder

1. Una vez registrado todos los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas. ¿Qué nombre científico le permite asignar a los microorganismos en estudio?
2. ¿Qué otras pruebas podrían realizarle a cada microorganismo para confirmar la especie?
3. ¿Cuál es el objetivo de la tipificación bacteriana?
4. ¿Qué detectan las pruebas bioquímicas?
5. Discutir la importancia de la identificación microbiana dentro del campo del ejercicio profesional farmacéutico.
6. A partir de las referencias adjuntas, grafique los resultados que se deberían observar para caracterizar las siguientes muestras:

A.	TSI: Pico-fondo; producción de gas; producción de SH <sub>2</sub>	Indol	Rojo metilo	Citrato	Oxidasa
<i>E. coli</i>	A/A; +/-	+	+	-	-



B.	Catalasa	Coagulasa
<i>S. aureus</i>	+	+



### REFERENCIAS

Booth, C. (1971). *Methods in microbiology*. Academic press.

Garcia, L. S. (Ed.). (2010). *Clinical microbiology procedures handbook* (Vol. 1). American Society for Microbiology Press.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2006). *Manual of clinical microbiology: Volume 2* (No. Ed. 9). ASM press.

Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (1998). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Mosby.

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 8: ANTIMICROBIANOS

### OBJETIVOS

- Describir las diferentes pruebas de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*.
- Comprender el procedimiento del método de Kirby Bauer.
- Comprobar el perfil de sensibilidad de microorganismos.

### INTRODUCCIÓN

El uso y abuso de los antimicrobianos en las terapias contra infecciones de origen bacteriano, conlleva a la selección de cepas bacterianas resistentes. La diseminación de estas resistencias a otras cepas de la misma o diferente especie se ve facilitada cuando los marcadores de resistencia (genes) se encuentran en elementos genéticos móviles como son plásmidos y/o transposones.

La sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina mediante **pruebas de sensibilidad antimicrobiana *in vitro***, basadas en la dilución o difusión del mismo en un medio de cultivo donde desarrolla el microorganismo en estudio.

### ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos forman un grupo heterogéneo de sustancias que interfieren en determinadas reacciones metabólicas de los microorganismos, ocasionando la detención de la multiplicación o la muerte de los mismos.

En realidad, solo los pertenecientes al grupo de los  $\beta$ -lactámicos, como las penicilinas entre otros, actúan exclusivamente contra las paredes bacterianas. Estos agentes bactericidas inhiben la síntesis de la pared celular, mientras que los demás antimicrobianos interfieren sobre los procesos metabólicos tanto del huésped como de las bacterias. La razón por la cual las bacterias son preferentemente afectadas, reside en el hecho de que los procesos metabólicos microbianos son más rápidos que los observados en las células del huésped.

Para ejercer su acción, deben alcanzar concentraciones suficientes en el sitio de la infección, siendo efectivo en muy baja concentración, por ejemplo 1/10 ppm. El fármaco debe atravesar varias barreras biológicas de permeabilidad variable, mediante difusión simple dependiendo de un gradiente de concentración o por medio de transporte en contra del gradiente de concentración.

A nivel celular, la acción de los antimicrobianos sobre las bacterias se ejerce por uno de los mecanismos siguientes (Figura 1):

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular. Ejemplo: Penicilinas, Cefalosporinas, entre otras.
- 2) Alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Ejemplo: Polimixinas, Imidazoles.
- 3) Inhibición de la síntesis de DNA. Ejemplo: Quinolonas (ciprofloxacina) y Rifamicinas (rifampicina).
- 4) Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (ribosomas). Ejemplo: sobre subunidad 30S: Tetraciclinas (minociclina), aminoglucósidos. Subunidad 50S: Macrólidos (eritromicina), Lincosamida (clindamicina).
- 5) Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana. Ejemplo: sulfonamidas (trimetoprima).

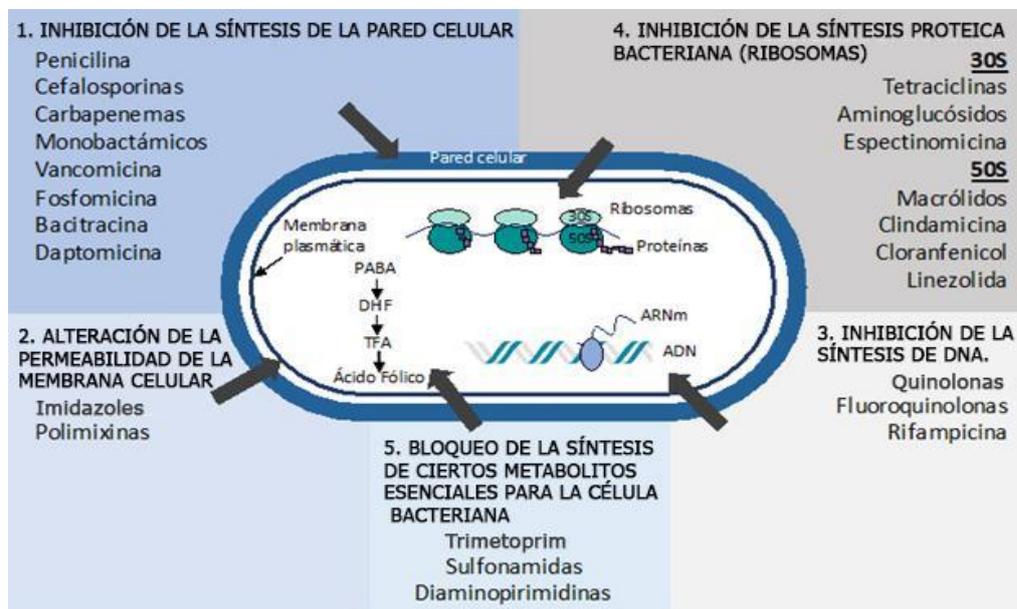


Figura 1. Mecanismos de acción de los antimicrobianos

La acción antibacteriana de los fármacos que actúan sobre la pared celular, se ejerce durante el proceso de crecimiento y replicación, por ejemplo, la penicilina que actúa en la etapa final de la formación de la pared, provocando la pérdida de la capacidad bacteriana para conservar su estructura ocasionando la lisis, debido a la hipo-osmolaridad circundante.

Los fármacos que alteran la función y permeabilidad de la membrana, modifican su estructura lipoproteica, lo que determina la pérdida de la barrera osmótica celular y anula funciones metabólicas oxidativas situadas en cercanías de dicha membrana, por ejemplo, la polimixina actúa como detergente que se une a radicales fosfatos de la membrana, disolviéndola.

Otros como la ciprofloxacina, actúa sobre la ADN girasa, enzima encargada del deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN.

Los antimicrobianos que alteran la síntesis proteica, determinando la formación de proteínas defectuosas, son bactericidas, como los Aminoglucósidos. Otros inhiben ciertos pasos metabólicos en la formación de proteínas y por lo tanto son bacteriostáticos como el cloranfenicol. El lugar de acción de cada uno de estos fármacos es variable.

Finalmente, los que inhiben la síntesis de metabolitos esenciales, tienen en general, una estructura semejante a ciertas moléculas esenciales para el metabolismo microbiano y a excepción de la Isoniazida que actúa incorporándose a la molécula de NAD, bloqueando el transporte de hidrógeno en la célula bacteriana, los demás son bacteriostáticos. Tanto las Sulfonamidas como las Sulfonas (como el ácido paraaminosalicílico), son parecidas en su estructura al ácido paraaminobenzoico, componente esencial en la síntesis del ácido fólico. La Trimetoprima, en cambio, actúa bloqueando la síntesis del ácido fólico por inhibición de la enzima reductora del mismo.

### **DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD EN EL LABORATORIO**

Los principales métodos utilizados para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano comprenden:

- **Las pruebas de dilución**, se realizan en tubos con caldo o en placas de agar.
- **Las pruebas de difusión**, se realizan en placas de agar usando discos de papel impregnados con el fármaco: Antibiograma
- **Pruebas en equipos automatizados**, como pueden ser el Vitek 2 o el Phoenix.

Cada método tiene sus ventajas y sus limitaciones:

En cuanto a las pruebas de sensibilidad por dilución en caldo, que fue una de las primeras en llevarse a cabo, aún hoy se sigue utilizando como método de referencia, dado que permite la determinación de la sensibilidad al fármaco. Es una técnica laboriosa, requiere mucho tiempo y es costosa, por lo que su uso queda limitado a casos especiales.

De los métodos de difusión en agar, el antibiograma, por la técnica de Kirby Bauer, es el más utilizado, por su reproducibilidad, para la selección inicial del agente terapéutico correspondiente y el más adecuado para el paciente.

Los equipos automatizados realizan pruebas de sensibilidad basados en microdilución en caldo, arrojando resultados de concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo en cuestión. Además, detectan mecanismos de resistencia como es el caso de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Como desventaja, se puede mencionar que requiere la instalación de equipos con software y costo elevado de insumos.

## **EL ANTIBIOGRAMA**

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antimicrobianos, pues no sólo pueden anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tienen consecuencias más graves a largo plazo para la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos ha adquirido tanta importancia y sea indispensable para lograr un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos.

El conocimiento de la sensibilidad a los antimicrobianos del microorganismo causante de una enfermedad, no solo es importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que permite seleccionar el más adecuado para el paciente, en caso de alergias o enfermedades de base.

Las pruebas de sensibilidad se indican para cualquier microorganismo causante de un proceso infeccioso que necesite tratamiento antimicrobiano y cuya sensibilidad no puede ser predicha. Existen microorganismos que muestran sensibilidad variable a los antimicrobianos de uso común: Estafilococos, Enterobacterias, Enterococos y algunos bacilos Gram (-) no fermentadores de glucosa como *Pseudomonas* sp.

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitor sobre la actividad antibacteriana de los quimioterápicos ensayados.

Las pruebas de **difusión en placas** para determinar la sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento, usualmente utilizan agar Müller-Hinton (MH), dado que se caracteriza por tener un pH estable entre 7,2 y 7,4 y buena reproducibilidad de resultados lote a lote; es pobre en contenido de timina (compiten con las sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas, lo que daría falsas resistencias) y es apto para el crecimiento de los patógenos más frecuentes.

Cuando se trata de *Streptococcus* u otros microorganismos exigentes, se le añade al medio Müller-Hinton 5 % de sangre desfibrinada, generalmente ovina.

De los métodos existentes, la técnica más utilizada es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración del antimicrobiano y medir el tamaño de la zona de inhibición del desarrollo del microorganismo.

## FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar MH, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Las placas se incuban durante 16-18 horas a 35-37 °C. Durante la incubación, el fármaco difunde radialmente desde el disco a través del agar MH (Figura 2.A), por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del fármaco en el medio de cultivo es incapaz de inhibir el desarrollo del germen en estudio (Figura 2.B).

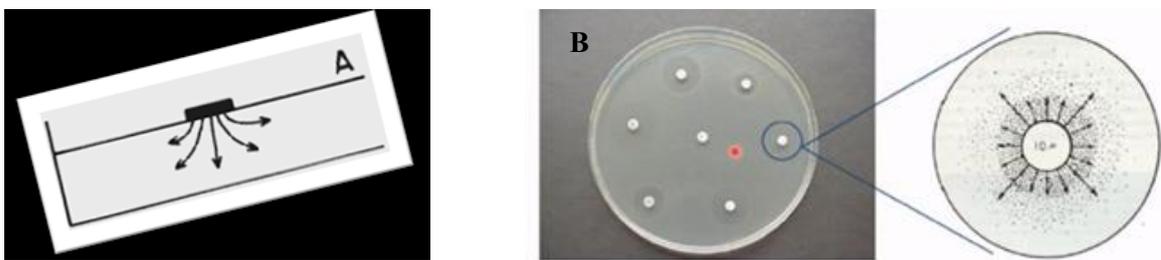


Figura 2: Método de difusión en agar. A. Difusión radial en el medio MH. B Difusión e inhibición del crecimiento bacteriano.

El diámetro de la zona, área o halo de inhibición alrededor del disco, puede ser interpretado a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R, respectivamente) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (*National Committee for Clinical Laboratories Standards*, actualmente CLSI: *Clinical Laboratory Standard Institute*).

Dado que las pruebas de sensibilidad *in vitro* dan solamente una idea aproximada de la acción inhibitoria contra los microorganismos, es importante mencionar que la verdadera respuesta de estos, ante los antimicrobianos, es la respuesta clínica del paciente luego de administrada la dosis adecuada.

## PRUEBA DE SENSIBILIDAD.

Para realizar el antibiograma por el método Kirby Bauer, se prepara el inóculo suspendiendo una cepa pura en caldo Muller Hinton, hasta alcanzar la concentración  $10^8$  bacterias por mL, equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland, patrón de turbidez.

Se siembra la superficie del agar utilizando un hisopo embebido en la suspensión microbiana, cubriendo la totalidad de la superficie del agar MH, primero en una dirección, luego rotar la placa 90° y luego rotar 45° más, para evitar dejar espacios sin inocular. Posteriormente, en un plazo no mayor a 15 minutos y de manera aséptica, colocar los discos con los antimicrobianos a probar, siguiendo las normas del CLSI vigente. Incubar durante 16-18 horas a 35-37 °C; Realizar la lectura e interpretación de resultados: medir el diámetro de los halos de inhibición e interpretar según manual (Anexo I) (Figura 3).

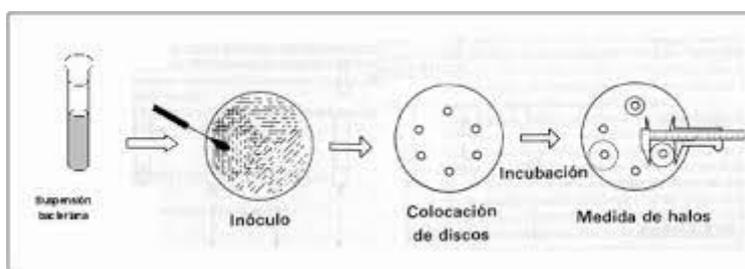


Figura 3: Pasos para realizar el método Kirby Bauer.

Cuando no se puede apreciar el halo, debido a que el desarrollo microbiano llega hasta el borde del disco, se registra como un halo de 6mm, que corresponde al diámetro del disco.

Cuando se observan halos superpuestos en la placa de antibiograma, puede corresponder a cultivos contaminados. Se deben realizar en tal caso, antibiogramas por separado de cada especie.

## DETERMINACIÓN DE LA CIM POR DILUCIÓN

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la mínima concentración de fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano, esto es la concentración del antimicrobiano contenida en el tubo que posee la mayor dilución del mismo en la que se detecta falta de turbidez. Y la concentración bactericida mínima (CBM) es la menor concentración del compuesto con bioactividad capaz de inducir la muerte in vitro del 99,9% del microorganismo testado.

Para determinar la CIM por dilución se procede de la siguiente manera:

1. Se realizan diluciones del antimicrobiano en tubos conteniendo 1 mL de caldo MH.
2. Se siembra 1 mL de una suspensión bacteriana de aproximadamente  $10^8$  bacterias por mL.
3. Se realiza un control de crecimiento inoculando un caldo sin antimicrobiano y un control negativo con caldo sin inocular.

4. Se incuban todos los tubos a 37 °C durante 24 horas. Luego se observa turbidez indicativa del desarrollo bacteriano.

5. Se determina así la CIM como aquella concentración del antimicrobiano contenida en el tubo que posee la mayor dilución del mismo en la que se detecta falta de turbidez. La mínima concentración que inhibe el crecimiento bacteriano.

### **DETERMINACIÓN DE LA CIM POR DILUCIÓN EN AGAR**

En el método de dilución en agar, el agente antimicrobiano es incorporado al medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano.

Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de los replicadores disponibles en el mercado, transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa.

El agar MH es preparado de una base deshidratada. El pH del agar debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. No deben añadirse cationes suplementarios.

Puede ser suplementado con 5 % de sangre de cordero desfibrinada o sangre de caballo lisada en el caso de realizar antibiograma para *Streptococcus pneumoniae*.

Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos no fastidiosos.

Sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento.

Generalmente las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina, pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepas.

### **OTRAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD**

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

En el caso de *Haemophilus influenzae*, debe utilizarse agar M.H. suplementado con 1 % de hemoglobina 0,5 % de sangre equina y 1 % de Isovitalax, suplemento VX o suplemento sintético equivalente y se ajusta el pH a 7,2.

Para Micobacterias, el agar de elección es Lowestein Jensen o agar 7H11, entre otros y requiere un tiempo de incubación más prolongado. Se realizan generalmente en laboratorios especializados.

Para anaerobios se realizan antibiogramas por métodos de dilución de antimicrobianos en caldo. También suelen realizarse en placas empleando otras técnicas.

### **CONTROL DE CALIDAD**

Conviene realizar quincenalmente controles con cepas para las cuales los halos de inhibición son conocidos. Así se evalúa la calidad de los discos, medios de cultivos y metodología utilizada. Estas cepas patrones son *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, entre otras.

El contenido de timina del medio MH debe controlarse con discos de trimetoprima-sulfametoxazol frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos de los microorganismos en estudio.

### ACTIVIDAD N°1. ANTIBIOGRAMA SEGÚN EL MÉTODO DE KIRBY BAUER

Realizar al microorganismo en estudio la prueba de sensibilidad a antimicrobianos por difusión en placa según el método Kirby Bauer.

1. Rotular con los datos del microorganismo en estudio el tubo de ensayo con los 2 mL de caldo MH.
2. Realizar la suspensión microbiana, para ello tomar con un ansa el microorganismo en estudio y homogeneizar.
3. Comparar la turbidez de la suspensión microbiana con el patrón 0,5 de la escala McFarland.
4. Ajustar la turbidez, si es necesario: agregando más inóculo o más caldo MH.
5. Rotular las placas Petri con el microorganismo en estudio.
6. Sembrar la totalidad de la superficie del agar MH con un hisopo estéril, primero en una dirección, luego rotar la placa 90° y luego rotar 45° más, para evitar dejar espacios sin inóculo.
7. Colocar asépticamente los discos de antimicrobianos de forma equidistante y circular a 2cm aproximadamente del borde de la placa.
8. Incubar de 16-18 horas a 35-37 °C.

### ACTIVIDAD N°2. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Medir los halos con regla o calibre, registrar e interpretar según las indicaciones del CLSI (2023) disponibles en el Anexo II.

## CUESTIONARIO GUÍA

**Utilizar la bibliografía de consulta y responder:**

1. Destaque la importancia en la clínica de la realización de un antibiograma.
2. Mencione el método que se realizó en el laboratorio y analice sus ventajas y sus limitaciones.
3. Concepto y definición de CIM y CBM. ¿Cómo se determinan experimentalmente?
4. ¿Cómo debe realizarse la colocación de discos y en qué momento del ensayo?

## TRABAJO PRÁCTICO N°9 CONTROL HIGIÉNICO DE MEDICAMENTOS

### OBJETIVOS

- Reconocer la importancia del control higiénico sanitario de productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles.
- Interpretar los criterios microbiológicos de aceptabilidad de la normativa vigente.
- Verificar si el producto farmacéutico se ajusta a la disposición ANMAT 6967/2022.

### INTRODUCCIÓN

El control higiénico sanitario de los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles contribuye a la seguridad e inocuidad de los mismos y evidencia el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Estos productos pueden albergar microorganismos no deseados que son potencialmente patógenos, pueden alterar el producto o servir como indicadores de deficiencias en la calidad higiénico sanitaria. Por lo tanto, establecer límites microbiológicos aceptables y realizar pruebas correspondientes es crucial para prevenir consecuencias adversas derivadas de la presencia de microorganismos en el uso de medicamentos.

Las formas farmacéuticas no estériles son aquellas que permiten una carga microbiana limitada, estableciendo la ausencia de microorganismos específicos según la vía de administración del medicamento. Durante el proceso de fabricación, estas formulaciones pueden contaminarse con bacterias, hongos y levaduras, por lo que es fundamental controlar tanto las poblaciones microbianas generales como los microorganismos específicos que sirven como indicadores de contaminación

El control higiénico sanitario de los productos farmacéuticos terminados, elaborados bajo condiciones asépticas, tiene como objetivo verificar que estos cumplan con los estándares microbiológicos establecidos por la normativa vigente. Actualmente, la regulación aplicable es la Disposición ANMAT 6967/2022 (Tabla 1).

**Tabla N°1.** Límites de aceptabilidad para el control microbiológico de productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles de acuerdo con la vía de administración

Vía de Administración	Recuento de microorganismos aerobios viables totales (RMAT) (UFC/g ó mL)	Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras (RLMT* <sup>1</sup> ) (UFC/g ó mL)	Microorganismos específicos (1g o mL)
Inhalatoria (excepto soluciones fisiológicas para nebulizar)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de bacterias Gram negativas tolerantes a la bilis Ausencia de Complejo <i>Burkholderia cepacea</i>
Oromucosal Gingival Nasal Auricular/ Ótica	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de Complejo <i>Burkholderia cepacea</i>
Cutánea (* <sup>2</sup> ) Parches transdérmicos (límites para un parche incluyendo la capa adhesiva y el soporte)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Vaginal	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de <i>Candida albicans</i>
Preparaciones acuosas para uso oral	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de Complejo <i>Burkholderia cepacea</i>
Preparaciones no acuosas para uso oral	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i>
Rectal	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	

(\*<sup>1</sup>) RLMT: "Recuento Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras" sigla en inglés: "Rapid Laboratory Microbial Test."

(\*<sup>2</sup>) Para preparaciones acuosas para vía de administración cutánea, investigar la ausencia de Complejo *Burkholderia cepacea*

El criterio de aceptación para la calidad microbiológica debe interpretarse de la siguiente manera.

- $10^1$  UFC/g o mL: el recuento máximo aceptable es 20
- $10^2$  UFC/g o mL: el recuento máximo aceptable es 200
- $10^3$  UFC/g o mL: el recuento máximo aceptable es 2000

El número de microorganismos presentes en un producto farmacéutico no obligatoriamente estéril, depende de diferentes factores de contaminación.

- **Factores intrínsecos a la formulación:** calidad higiénica de las materias primas, formulaciones con actividad antimicrobiana, conservantes, pH, actividad del agua, potencial de óxido reducción, etc.
- **Factores extrínsecos a la formulación:** personal de trabajo, materiales, todas las condiciones higiénicas durante la manufactura, el contenido microbiano del material de empaque, medio ambiente, etc.

El control higiénico sanitario de productos farmacéuticos no estériles se realiza por duplicado o triplicado según las etapas que se describen a continuación

### **1. ENSAYOS GENERAL**

Preparación de microorganismos de prueba

Preparación del inóculo

Promoción del crecimiento en los medios de cultivo o Control positivo

Control de esterilidad en los medios de cultivo o Control negativo

### **2. ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO**

Preparación de la muestra o producto farmacéutico

Método de recuento microbiano en presencia del producto farmacéutico: Recuento en placa.

Recuperación de microorganismos

Recuento microbiano

Comparación de los recuentos con el control positivo

### **3. MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA**

Aumento del volumen de diluyente o medio de cultivo

Incorporación de una agente neutralizante

Filtración por membrana

### **4. ENSAYO DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS**

Preparación de microorganismos específicos.

Preparación del inóculo.

Promoción del crecimiento en los medios de cultivo o Control positivo.

Control de esterilidad en los medios de cultivo o Control negativo.

## 5. ENSAYO FINAL DE PRODUCTO

### 1. ENSAYO GENERAL

Bajo este concepto se agrupan las condiciones diseñadas, para evitar la contaminación microbiana externa del producto a examinar: las áreas de producción deben estar mantenidas bajo estrictas normas de limpieza, los productos, equipos y materiales utilizados deben estar en condiciones óptimas de pureza y seguridad, el personal involucrado en la fabricación y manejo de los productos debe estar debidamente capacitado y calificado para garantizar la correcta aplicación de las prácticas higiénico-sanitarias. Las medidas que se realicen para evitar dicha contaminación, no deben afectar a ningún microorganismo que pudiera estar presente en la muestra.

#### • Preparación de los Microorganismos de Prueba

Los microorganismos de prueba se requieren para valorar las condiciones de los medios de cultivo, validar los métodos utilizados y verificar la aptitud de los métodos de ensayo. Se obtienen directamente de colecciones de cultivo microbiano nacionales o internacionales reconocidas, como: *American Type Culture Colección* (ATCC):

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404

Siguiendo lineamientos de la Farmacopea Argentina 8<sup>va</sup> edición, deben provenir de cultivos de no más de cinco (5) pasajes desde su extracción del cultivo original, inocularse por separado y en sus respectivos medios de cultivo (Tabla 2).

#### • Preparación del Inoculo

El inóculo consiste en la concentración de microorganismos utilizado para realizar un cultivo microbiano. Para ello se cultiva por separado cada uno de los microorganismos de prueba. Se pueden utilizar suspensiones estandarizadas adquiridas comercialmente, también se pueden

preparar suspensiones partiendo de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas en medios nutritivos sólidos.

### Procedimiento

En solución fisiológica o Caldo Digerido de Caseína Soya, a partir de una UFC, se realiza la suspensión microbiana, inóculo, para cada microorganismo de prueba. El cual, para ajustarse a las especificaciones, no debe ser superior a 100 UFC/mL.

- **Promoción del Crecimiento en los Medios de Cultivo o Control Positivo**

La promoción del crecimiento microbiano se realiza para verificar el buen estado de cada medio de cultivo, evidenciar la capacidad de promover el crecimiento microbiano, para ello se utiliza la suspensión microbiana de cada microorganismo de prueba.

### Procedimiento

Se realizan ensayos independientes para cada uno de los microorganismos de prueba mediante el método de siembra por vertido en placa (Figura 1).

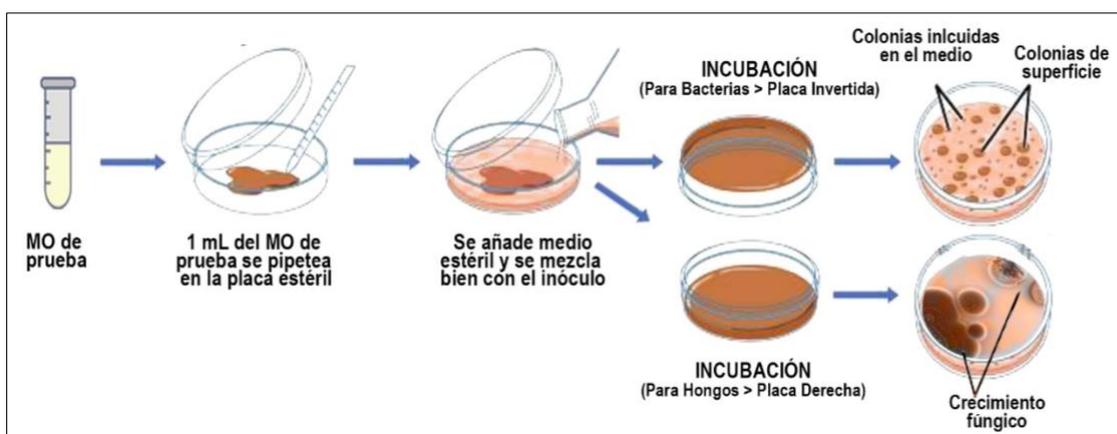


Figura 1: Método de siembra por vertido en placa: Control positivo

Se agita el inóculo y se transfiere 1 mL a cada placa de Petri esterilizada. Seguidamente se añaden de 15 a 20 mL de agar Digerido de Caseína-Soja o agar Sabouraud Dextrosa, previamente fundido y enfriado a 45°C, se tapan las placas, se homogenizan mediante rotación y se dejan solidificar a temperatura ambiente. Se incuban en las condiciones de temperatura y tiempo establecidas (Tabla 2).

### Interpretación

Los medios de cultivo son aceptables si se evidencia desarrollo de UFC en las placas inoculadas con los microorganismos de prueba dentro de los parámetros de incubación establecidos para bacterias y hongos.

- **Control de Esterilidad en los Medios de Cultivo o Control Negativo**

Se realiza para asegurar que los medios de cultivos no provoquen contaminación alguna al ensayo.

**Procedimiento**

Los medios de cultivo estériles, fraccionados, solidificados y no inoculados, se incuban siguiendo las condiciones establecidas de temperatura y tiempo (Tabla 2) (Figura 2).

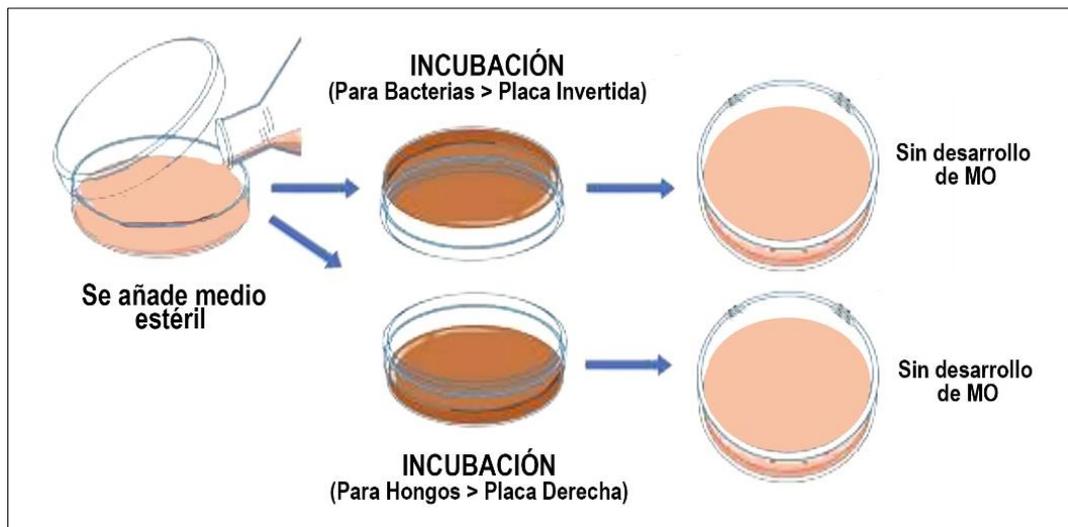


Figura 2: Método de siembra por vertido en placa: Control negativo

**Interpretación**

Para confirmar la esterilidad, los medios de cultivo no deben evidenciar ningún crecimiento microbiano después de la incubación.

**Tabla 2.** Preparación y uso de microorganismos de prueba para recuento

Microorganismo	Preparación de MO de prueba	Promoción del crecimiento		Aptitud del método de recuento en presencia del producto (muestra)	
		Recuento total de MO aerobios	Recuento total de hongos filamentosos y levaduras	Recuento total de MO aerobios	Recuento total de hongos filamentosos y levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Agar Digerido de Caseína-Soja	Agar Digerido de Caseína-Soja /		Agar Digerido de Caseína-Soja /	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	o	NMP:	-	NMP:	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35°C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 3 días		Caldo Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 3 días	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Agar Sabouraud Dextrosa, Agar Papa-Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20°-25°C 2-3 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20°-25 °C ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 5 días  NMP: No aplica	Agar Sabouraud Dextrosa, y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20°-25 °C ≤ 5 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Agar Sabouraud Dextrosa, Agar Papa-Dextrosa 20°-25°C 5-7 días o hasta alcanzar una buena esporulación	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20°-25 °C ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30°-35 °C ≤ 5 días  NMP: No aplica	Agar Sabouraud Dextrosa, y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20°-25 °C ≤ 5 días

## 2. ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO

El objetivo de este ensayo es demostrar que el método de recuento microbiano, realizado en presencia del producto farmacéutico, es adecuado y que los resultados obtenidos representan una estimación precisa de la población microbiana presente en la muestra analizada. Los lineamientos generales se encuentran en la (Tabla 2) (Figura 3).

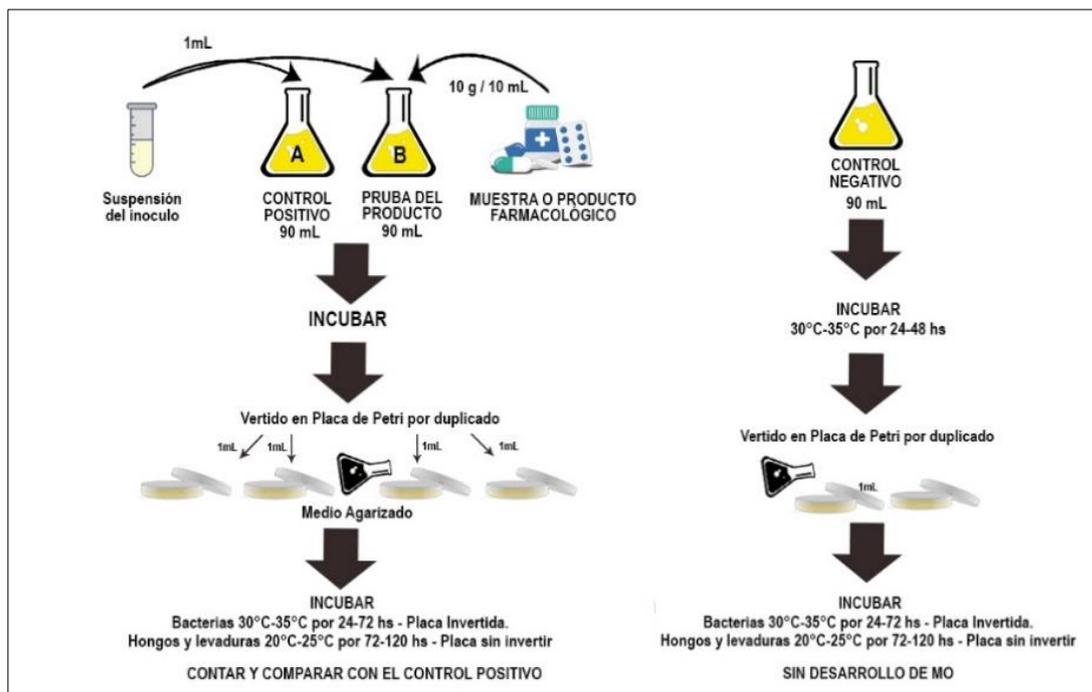


Figura 3: Ensayo de aptitud del método

- **Preparación de la muestra o producto farmacéutico**

La muestra, consiste en el producto farmacéutico en ensayo, se prepara mediante un tratamiento que se ajuste a sus características físicas y que no altere el número ni el tipo de microorganismos originalmente presentes, a fin de obtener una solución o suspensión apropiada. Se utiliza una cantidad de 10 g o 10 mL de la muestra, junto con un diluyente adecuado, como el caldo Digerido de Caseína-Soja o una solución reguladora de fosfato con pH 7.2, entre otros. Generalmente, se prepara una dilución 1 en 10. Además, se debe tener en cuenta la solubilidad que presenta el producto: si es soluble en agua (se disuelve o diluye en buffer), si es insoluble en agua (se dispersa o se suspende en buffer), o si es una muestra grasa (se disuelve el producto en un tensioactivo, como miristato de isopropilo o se mezcla con polisorbato 80).

## Procedimiento

Para cada microorganismo mencionado, se llevan a cabo ensayos individuales. De manera aséptica, se abre el recipiente con la muestra, se extraen 10 mL y se transfieren a un Erlenmeyer con 90 mL del diluyente indicado. Posteriormente, la mezcla se homogeniza, se añade 1 mL del inóculo, se homogeniza nuevamente y se incuba bajo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas (Tabla N°2).

- **Recuento microbiano en placa en presencia de producto**

Este es el método recomendado para estimar la cantidad de microorganismos en una muestra. Existen otros métodos de recuento (Anexo III).

### a) Recuperación de microorganismos

Para enumerar los microorganismos de la muestra, primero se recuperan por el método de vertido en placa; para ello se agita y se transfiere 1 mL del contenido del Erlenmeyer a cada placa de Petri estéril. Seguidamente se añaden de 15 a 20 mL de Agar Digerido de Caseína-Soja o Agar Sabouraud Dextrosa, previamente fundido y enfriado a 45°C, se tapan las placas y se homogenizan mediante rotación y se dejan solidificar a temperatura ambiente. Se incuban en las condiciones de temperatura y tiempo establecidas (Tabla 2) (Figura 4)

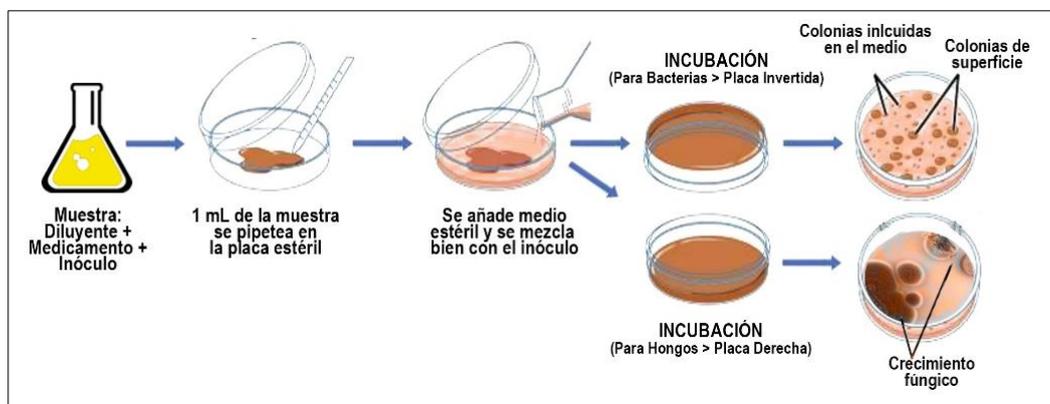


Figura 4: Método de siembra por vertido en placa: Recuperación de microorganismos

### b) Recuento microbiano

Luego de la incubación, se examinan las placas para verificar el desarrollo microbiano.

El recuento microbiano consiste en contar el número de colonias y expresar el promedio de las placas en términos de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g o por mililitro (UFC/mL) de muestra (Anexo III).

### c) Comparación de los recuentos de la muestra con el control positivo

Se compara la cantidad de microorganismos recuperados de la muestra con el número de microorganismos del control positivo o promoción del crecimiento para evaluar su efectividad.

#### Interpretación

Si el recuento microbiano observado es similar en ambos casos, se concluye que el producto farmacéutico **no interfiere en el crecimiento microbiano**, esto indica que el método utilizado es adecuado y cumple con la prueba de aptitud para el análisis de recuento de la muestra.

Si el recuento microbiano es **diferente o inexistente**, será necesario **revisar y modificar la técnica empleada** para asegurar la validez de los resultados.

Estos resultados se evaluarán según los criterios de aceptación establecidos para la carga microbiana en productos farmacéuticos que no necesariamente son estériles, variando según su vía de administración, como se especifica en la (Tabla 1)

- Si no se detectan colonias en las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, los resultados se expresaran como menos de 10 UFC g/mL de muestra.
- El RMAT se informará como la sumatoria de todas las colonias desarrolladas en las placas de agar Digerido de Caseína-Soja incluyendo hongos y levaduras.
- El RTCHL se considera equivalente al número de UFC encontrado empleando agar Sabouraud Dextrosa o agar Papa Dextrosa. Si se detectan colonias de bacterias en este medio, contarlas como parte de RTCHL.

### 3. MODIFICACIONES DE LA TÉCNICA

La técnica se modifica cuando el número de microorganismos recuperados de la muestra es diferente o inexistente en comparación con el control positivo, en otros términos, el producto en ensayo posee actividad antimicrobiana, la cual debe eliminarse o neutralizarse y puede deberse a varias causas:

- a) El método de recuento utilizado no es óptimo para la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra o producto farmacéutico.
- b) El método empleado interfiere con el desarrollo microbiano.
- c) La muestra o producto farmacéutico **inhibe** el crecimiento microbiano
- d) Se realiza nuevamente el "Ensayo de Aptitud del Método" con algunas modificaciones, que pueden incluir:

- **Aumento del volumen del diluyente o medio de cultivo:** Se utiliza un mayor volumen de diluyente o medio de cultivo para la dilución del producto farmacéutico, manteniendo la misma cantidad de muestra a ensayar.
- **Incorporación de un agente neutralizante:** Estos compuestos deben ser eficaces y de baja toxicidad, se utilizan para contrarrestar la actividad de los agentes antimicrobianos presentes en el fármaco (Anexo III Tabla 5 y 6) (Figura 5).

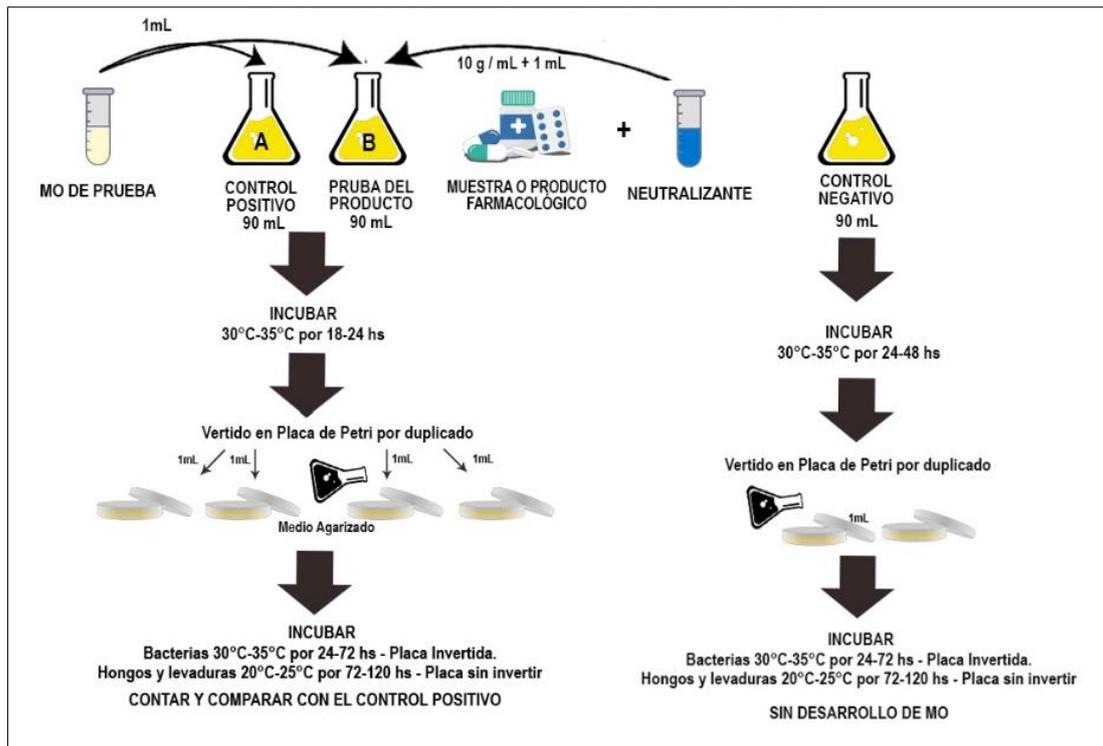


Figura 5: Modificación de la técnica: Incorporación de agente neutralizante

- **Filtración por Membrana:** Se utiliza un dispositivo que permite colocar una membrana, eligiendo un material filtrante que no afecte la eficacia de retención microbiana por los componentes de la muestra. Tras la filtración, la membrana se retira del dispositivo y se coloca en un medio de cultivo adecuado para el recuento microbiano.

#### 4. MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

Para cada uno de los siguientes microorganismos específicos se realizan los ensayos descritos en los apartados Ensayo General y Ensayos de Aptitud del Método, según las condiciones detalladas en (Tabla 3).

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Salmonella spp.* ATCC 14028
- *Clostridium sporogenes* ATCC 19404
- *Cándida albicans* ATCC 10231

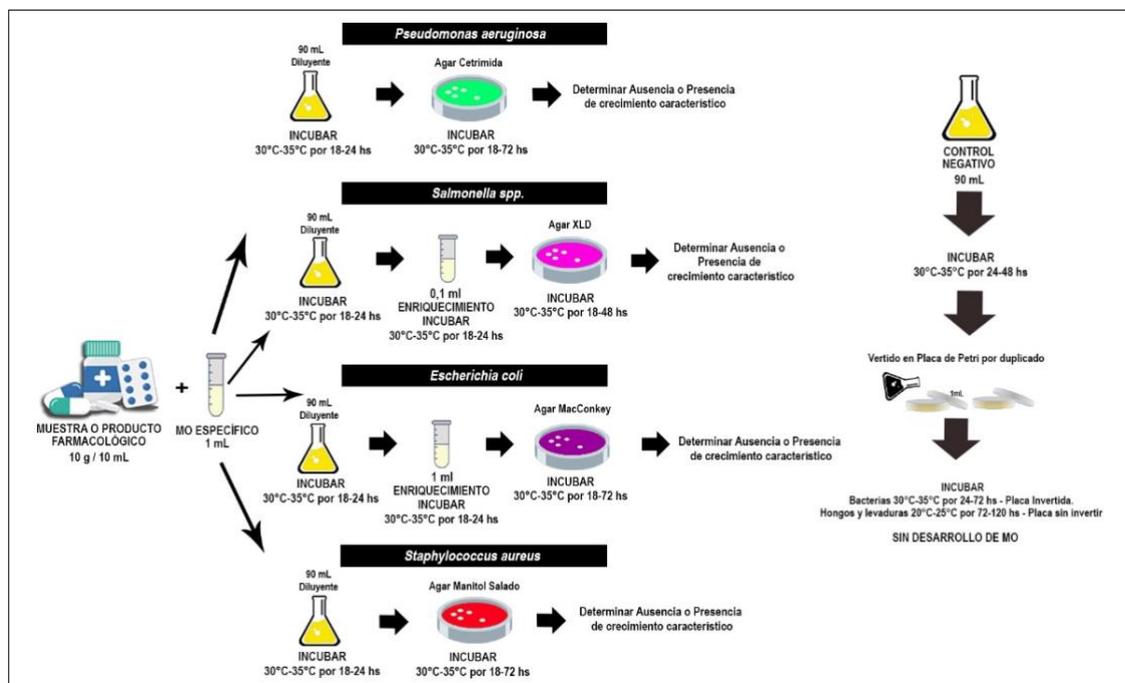


Figura 6: Ensayo de aptitud del método: Microorganismos específicos aerobios

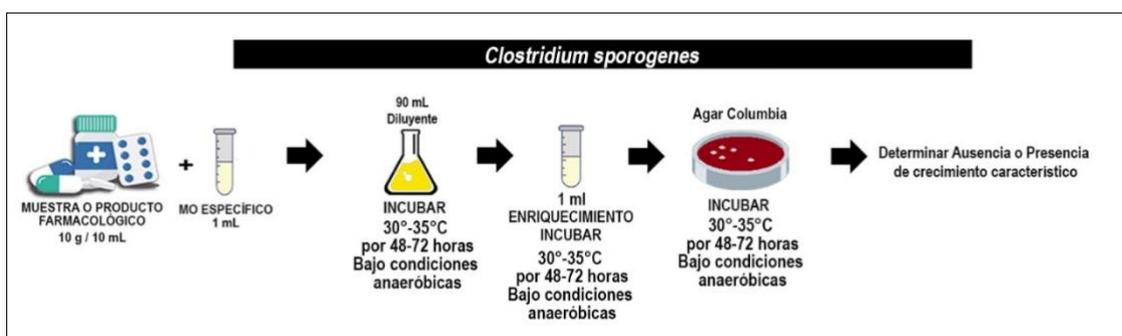


Figura 7: Ensayo de aptitud del método: Microorganismo específico anaerobio

Los resultados obtenidos permitirán evaluar si es necesario que se modifique la técnica utilizada.

- **Ensayo de aptitud del método para bacterias específicas: *Escherichia coli***

## Procedimiento

Un Erlenmeyer conteniendo 90 mL de diluyente, 10 mL o 10 g de producto farmacéutico más 1 mL de inóculo del microorganismo específico, se incuba en condiciones de temperatura y tiempo establecidos (Tabla 3) (Figura 8).

Seguidamente se sub-cultiva en caldo Mac Conkey o caldo lactosado a temperatura y tiempo establecido (Tabla 3).

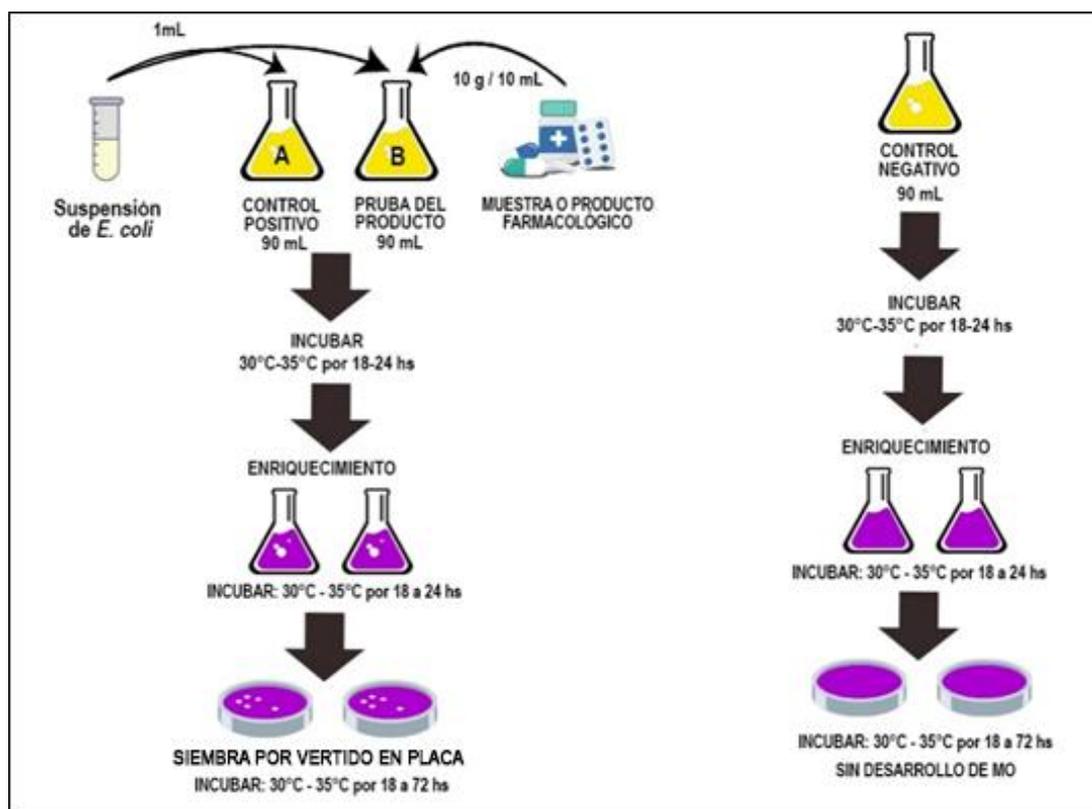


Figura 8: Ensayo de aptitud del método microorganismo específico: *Escherichia coli*.

## Interpretación

Si el crecimiento microbiano es similar al control positivo del microorganismo en cuestión, el producto farmacéutico no interfiere en el crecimiento microbiano, además indica que el método utilizado es adecuado y cumple con la prueba de aptitud del método para microorganismos específicos.

De lo contrario si el recuento microbiano es deficiente o inexistente será necesario revisar y modificar la técnica empleada para asegurar la validez del método.

- Ensayo de aptitud del método para hongos específicos: *Candida albicans*

### Procedimiento

Un Erlenmeyer conteniendo 90 mL de diluyente, 10 mL o 10 g de o producto farmacéutico más 1 mL de inóculo del microorganismo específico, se incuba en condiciones de temperatura y tiempo establecidos (Tabla 3).

Se recupera el microorganismo por el método de vertido en placa en Agar Sabouraud Dextrosa, se incuba a temperatura y tiempo establecido (Tabla 3).

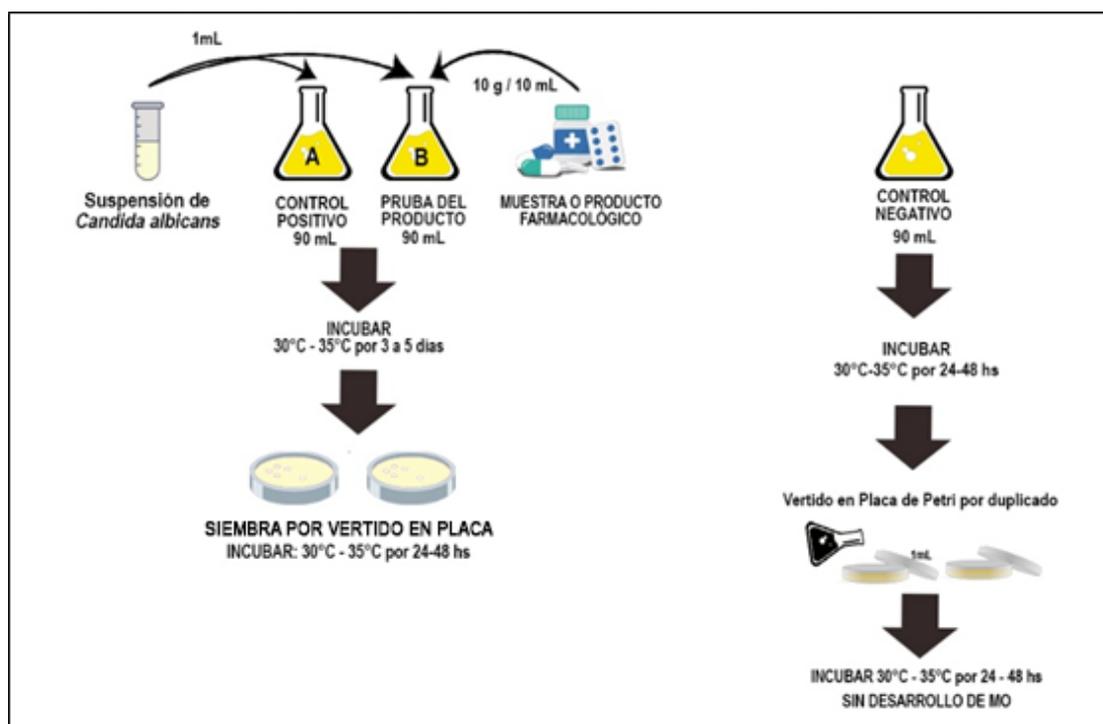


Figura 9: Ensayo de aptitud del método microorganismo específico: *Candida albicans*.

### Interpretación

Si el crecimiento microbiano es similar al control positivo del ensayo general, el producto farmacéutico no interfiere en el crecimiento microbiano además indica que el método utilizado es adecuado y cumple con la prueba de aptitud del método para microorganismos específicos. De lo contrario si el recuento microbiano es deficiente o inexistente será necesario revisar y modificar la técnica empleada para asegurar la validez del método.

Tabla 3: Preparación y uso de microorganismos específicos

Promoción del crecimiento	
---------------------------	--

Microorganismo		Propiedades nutritivas-selectivas	Propiedades inhibitorias	Propiedades indicadoras del medio selectivo	Aptitud del método de investigación en presencia del producto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Mossel para enriquecimiento de enterobacterias. 30°-35°-C 24-48 horas  Caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella 30°-35°°C 18-24 horas Agar MacConkey 30°-35°C 18-72 horas	Agar Manitol salado 30°-35°C 18-72 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35°C 18-24 horas  Agar Manitol Salado 30-35°C 18-72 horas  <b>Coco G (+) Colonias amarillas con halos amarillos</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35°C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas  Caldo Mossel para enterobacterias 30°-35°C 24-48 horas		Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa 30°C-35°C 18-24 horas  Agar Cetrimida 30°-35°C 18-72 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°C-35°C  Agar Cetrimida 30°C-35°C 18-72 horas  <b>Bacilos G (-) Colonias verdosas</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35°C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas  Caldo Mossel para enterobacterias 30°-35°C 24-48 horas  Agar MacConkey EMB 30°-35°C 18-72 horas	Agar Cetrimida 30°C-35°C 18-72 horas  Agar Manitol Salado 30°-35°C 18-72 horas	Agar MacConkey 30°-35°C 18-72 horas  Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro Bilis-Glucosa 30°-35°C 18-48 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°C-35°C Agar MacConkey-EMB 30°-35°C 18-72 horas  <b>Bacilos G (-) Colonias rojas con halo turbio</b>

<p><i>Salmonella spp.</i> ATCC 14028</p>	<p>Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35°C 18-24 horas</p>	<p>Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35 °C 18-24 horas</p> <p>Caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella 30°-35%°C 18-24 horas</p> <p>Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) 30°-35°C 18-48 horas</p>		<p>Agar XLD 30°-35°C 18-48h</p>	<p>Caldo Digerido de Caseína-Soja 30°-35 °C 18-24 horas</p> <p>Caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella 30°-35%°C 18-24 horas</p> <p>Agar XLD 30°-35°C 18-48 horas</p> <p><b>Bacilos G (-) Colonias rojas con o sin centro negro</b></p>
<p><i>Cándida albicans</i> ATCC 10231</p>	<p>Agar Sabouraud Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20°-25°C 2-3 días</p>	<p>Caldo Sabouraud Dextrosa 30-35°C 3-5 días</p> <p>Agar Sabouraud Dextrosa 30°-35°C 24-48 horas</p>	-	-	<p>Caldo Sabouraud Dextrosa 30-35°C 3-5 días</p> <p>Agar Sabouraud Dextrosa 30°-35°C 24-48 horas</p> <p><b>Levadura redondeada-ovoidea colonias blancas cremosas</b></p>
<p><i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437</p>	<p>Medio Reforzado para Clostridios 30-35°C 24-48h</p>	<p>Medio fluido tioglicolato con azida sódica 30-35°C 48- 72h bajo condiciones anaerobicas</p>	-	<p>Agar sulf--ito polimixina sulfadiacina 30-35°C 5-7 dias bajo condiciones anaerobicas</p>	<p>Agar columbia 30-35°C 48- 72h bajo condiciones anaerobicas</p>

Una vez realizadas las pruebas de aptitud del método con los microorganismos de prueba y con los microorganismos específicos y si fuere necesario modificar la técnica, se procede a realizar el Ensayo final del producto farmacéutico.

## **5. ENSAYO FINAL DEL PRODUCTO**

En el ensayo final del producto se realizan los recuentos de (RMAT), (RLMT) además se investiga la presencia de microorganismos específicos.

La búsqueda de microorganismos específicos reviste carácter cualitativo, ya que determina la ausencia o presencia de microorganismos específicos en 1 g o mL de producto de acuerdo con la vía de administración (Tabla1).

La muestra cumple con los requisitos de ausencia del microorganismo específico por g o mL cuando no se observan colonias con las características típicas o cuando las pruebas de identificación resultan negativas.

## **DESARROLLO DE TRABAJO PRACTICO**

Los estudiantes seguirán las instrucciones del profesor durante las actividades orientadas a la realización del control higiénico sanitario de un producto farmacéutico no estéril de administración oral.

### **ACTIVIDAD N°1. ENSAYO GENERAL**

#### **Microorganismos de prueba**

#### **DÍA 1**

##### **1-Suspensión de inóculo**

Realizar la suspensión de cada uno de los microorganismos de prueba a partir de una estría en pico de flauta.

##### **2-Promoción del crecimiento**

Inocular cada microorganismo de prueba en los medios de cultivo correspondientes por el método de vertido en placa (Tabla 2).

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

##### **3-Control de esterilidad del medio o control negativo**

Fraccionar en placas Petri los medios de cultivo esterilizados y no inoculados.

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

#### **DÍA 2.**

##### **Recuento en placa de microorganismos de prueba**

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las placas como el número de UFC/g o UFC mL.

Interpretar los resultados.

### **ACTIVIDAD N°2. ENSAYO GENERAL**

#### **Microorganismos específicos**

#### **DÍA 1**

##### **1-Suspensión de inóculo**

Realizar la suspensión de cada uno de los microorganismos específicos a partir de una estría en pico de flauta.

##### **2-Promoción del crecimiento**

Inocular cada microorganismo específico en los medios de cultivo correspondientes por el método de vertido en placa (Tabla 3).

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

### **3-Control de esterilidad del medio o control negativo**

Fraccionar en placas Petri los medios de cultivo esterilizados y no inoculados.

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

## **DÍA 2.**

### **Recuento en placa de microorganismos específicos**

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las placas como el número de UFC/g o UFC mL de muestra.

Interpretar los resultados.

## **ACTIVIDAD N°3. ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO**

### **Preparación de la muestra con microorganismos de prueba**

#### **DÍA 1**

#### **Suspensión de inóculo**

Realizar la suspensión del microorganismo de prueba, a partir de una estría en pico de flauta.

Incorporar de modo aséptico al Erlenmeyer que contiene 90 mL del diluyente 1 mL del inóculo con el microorganismo de prueba y 10 mL del producto farmacéutico. Homogeneizar.

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

#### **DÍA 2**

#### **Recuperación de microorganismos de prueba**

Recuperar el microorganismo de prueba del Erlenmeyer que contiene el diluyente y la muestra, por el método de vertido en placa.

Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

#### **DÍA 3**

#### **Recuento de microorganismos de prueba**

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las placas como el número de UFC/g o UFC mL de muestra.

Interpretar los resultados

Comparar con el control positivo

Evaluar la modificación de la técnica.

## **ACTIVIDAD N°4. Preparación de la muestra con Microorganismos específicos**

### **DÍA 1**

#### **Suspensión de inóculo**

Realizar la suspensión del microorganismo de específico, a partir de una estría en pico de flauta. Incorporar de modo aséptico al Erlenmeyer que contiene 90 mL del diluyente, 1 mL del inóculo con el microorganismo específico y 10 mL del producto farmacéutico. Homogeneizar. Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

### **DÍA 2**

#### **Recuperar microorganismos específicos**

Recuperar el microorganismo específico del Erlenmeyer que contiene el diluyente y la muestra, por el método de vertido en placa. Incubar a temperatura y tiempo establecidos.

### **DÍA 3**

#### **Recuento de microorganismos de prueba**

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las placas como el número de UFC/g o UFC mL de muestra. Interpretar los resultados. Comparar con el control positivo. Evaluar, modificación de la técnica.

## **ACTIVIDAD N°5. ENSAYO FINAL DE PRODUCTO**

Realizar el ensayo del producto farmacéutico

## **ACTIVIDAD N°6. PRESENTACIÓN DE INFORME.**

Redactar un informe con los resultados registrados y las conclusiones a las que arriban.

## **ACTIVIDAD N°7. INVESTIGACION BIBLIOGRÁFICA**

Investigar las características de los siguientes microorganismos o grupos de microorganismos y su relación cualitativa o cuantitativa en los productos farmacéuticos no estériles.

- *Burkholderia cepacea*
- Enterobacterias
- Sulfitorreductores

Comparar la metodología de control higiénico de productos no estériles utilizada en el trabajo práctico con las existentes en otras farmacopeas.

Investigar la normativa vigente en el país para el control microbiológico de productos estéril.

### **REFERENCIAS**

Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos.

Disposición Vigente ANMAT 6967/2022.

Farmacopea Nacional Argentina. (2018). Farmacopea Nacional Argentina 8ª edición: Primer tomo. Capítulo 90. Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles. Ministerio de Salud de la Nación.

Revista Científica ANMAT. (2023). Revista Científica ANMAT (Vol. 4). ISSN 2796-7649.

## ANEXO I

### CLORO Y COMPUESTOS CLORADOS

Los desinfectantes basados en el cloro generalmente están disponibles en forma líquida como hipoclorito de sodio (lejía), o sólida como hipoclorito de calcio (dicloroisocianurato de sodio).

**Mecanismo de acción:** Su acción produce inhibición de las reacciones enzimáticas, desnaturalización de las proteínas e inactivación de los ácidos nucleicos.

**Espectro:** Virus, bacteria y hongos (micobactericida).

**Ventajas y desventajas:** Su acción es rápida, de bajo costo y de fácil manejo.

Tiene propiedades desodorizantes y actividad microbicida atribuible al ácido hipocloroso no disociado. La disociación de este ácido, y por consiguiente la menor actividad, depende del pH. Su eficiencia disminuye por el aumento del pH. Tiene actividad corrosiva, se inactiva en presencia de materia orgánica, produce irritación de las mucosas, se polimeriza por los rayos de sol y necesita estar protegida en envases opacos. Las soluciones de cloro no deben conservarse en envases destapados por más de 12 horas debido a la evaporación del producto activo, haciendo que las concentraciones de cloro disponible disminuyan de 40% a 50%.

**Concentraciones de uso:** La concentración mínima para eliminar las micobacterias es de 1000 ppm (0.1%) durante 10 minutos. No deben sumergirse objetos por más de 30 minutos debido a su actividad corrosiva. Se recomienda, además, el enjuague abundante para evitar irritación química debido a los posibles residuos. Es importante señalar que existen muchos factores que afectan la estabilidad del cloro, tales como la presencia de iones pesados, pH de la solución, temperatura de la solución, presencia de biofilmes, presencia de materias orgánicas y radiación ultravioleta.

#### **Fórmula para preparar una solución de hipoclorito:**

$$cc = \text{Litros de agua} \times \text{ppm} / \text{Concentración de compra}$$

Donde:

**cc:** centímetros cúbicos de hipoclorito de sodio a agregar a la preparación

Litros de agua: cantidad de solución final a preparar.

**ppm:** partes por millón (concentración final a preparar).

Concentración de compra:

- Casera 5.25%.
- Concentrada 10%.
- Piscinas 12%

**Concentraciones de uso en el ámbito hospitalario:**

10.000 ppm = 1% = Concentración para desinfección de derrames, previa limpieza.

**5.000 PPM = 0.5% = DESINFECCIÓN DE MATERIALES, PREVIA LIMPIEZA.**

1.000 ppm = 0.1% = Desinfección de áreas críticas, previa limpieza.

100 a 500 ppm = 0.01 a 0.05% = Desinfección de áreas no críticas.

**Referencia:** AMR-Manual\_Esterilizacion\_Centros\_Salud\_2008

**ANEXO II**

**Tabla: Síntesis de los puntos de corte para los antibióticos más utilizados en clínica (CLSI 2023)**

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		RESISTENTE < o igual	INTERMEDIO	SENSIBLE > o igual

**BETALACTAMICOS. PENICILINAS**

<b>Ampicilina</b>				
Enterobacterias	10 ug	13	14-16	17
Enterococos	10 ug	16	-	17
Estreptococos beta hemolíticos	10 ug	-	-	24
<b>Oxacilina</b>				
Neumococos para evaluar la sensibilidad a penicilina	1 ug	-	-	20
<b>Piperacilina</b>				
Pseudomonas spp	100 ug	17	18-21	22

**COMBINACION CON INHIBIDORES BETA LACTAMASA**

<b>Amoxicilina/Acido Clavulanico</b>				
Enterobacterias	20/10 ug	13	14-17	18
<b>Ampicilina/Sulbactama</b>				
	10/10 ug	11	12-14	15
<b>Piperacilina/Tazobactama</b>				
Enterobacterias	100/10 ug	20	21-24	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100/10 ug			

**CEFALOSPORINAS**

<b>Cefazolina</b>				
	30 ug	19	20-22	23
<b>Cefepime</b>				
	30ug	18	19-24	25

<b>Cefotaxima</b>	30 ug	22	23-25	26
<b>Cefoxitina</b>	30 ug	14	15-17	18
<b>Ceftazidima</b>	30 ug	17	18-20	21
<b>Ceftriaxona</b>	30 ug	19	20-22	23
<b>Cefuroxima</b>	30 ug	14	15-17	18
<b>CARBAPENEMES</b>				
<b>Imipenem</b>	10 ug	19	20-22	23
<b>Meropenem</b>	10 ug	19	20-22	23
<b>MONOBACTAMAS</b>				
<b>Aztreonam</b>	30 ug			
Enterobacterias		17	18-20	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		15	16-21	22
<b>GLUCOPEPTIDOS</b>				
<b>Teicoplanina</b>	30 ug	10	11-13	14
<b>Vancomicina</b>				
Enterococos	30 ug	14	15-16	17
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>				
<b>Amicacina</b>				
Enterobacterias	30 ug	16	17-19	20
<b>Gentamicina</b>				
Enterobacterias	10 ug	14	15-17	18
<b>MACROLIDOS</b>				
<b>Azitromicina</b>	15 ug	13	14-17	18
<b>Eritromicina</b>	15 ug	13	14-22	23
<b>TETRACICLINAS</b>				
<b>Minociclina</b>	30 ug	14	15-18	19

<b>Tetraciclina</b>	30 ug	14	15-18	19
<b>QUINOLONAS</b>				
<b>Ciprofloxacina</b>				
Enterobacterias	5 ug	21	22-25	26
<b>Levofloxacina</b>	5 ug	16	17-20	21
<b>OTROS ANTIMICROBIANOS</b>				
<b>Clindamicina</b>	2 ug	14	15-20	21
<b>Rifampicina</b>	5 ug	16	17-19	20
<b>Nitrofurantoina</b>	300 ug			
Enterobacterias				
<b>Trimetoprima/Sulfametoxazol</b>	1.25/23.75 ug	10	11-15	16

## ANEXO III

### MÉTODO DE RECuento

Son cuantitativos ya que enumeran los microorganismos presentes en una muestra y su capacidad para desarrollar una acción benéfica o perjudicial. Los ensayos se realizan por duplicado o triplicado para mayor precisión y para la expresión de los resultados se utilizan valores promedio. Estos resultados se evalúan con los criterios de aceptación de una carga microbiana para los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles, establecidos en la (Tabla 1)

Los métodos de recuento utilizados son: filtración por membrana, recuento en placa y el método del número más probable (NMP).

#### 1- Filtración por Membrana

Utiliza filtros de membrana con un tamaño de poro no mayor a  $0.45\ \mu\text{m}$ , de tal manera que la eficacia de retención de las bacterias no se vea afectada por los componentes de la muestra.

La muestra preparada se filtra y luego se lava la membrana filtrante con un volumen del diluyente. Para la determinación de RMAT, se transfiere la membrana filtrante a la superficie del Agar-Agar con Hidrolizado de Caseína y de Soja. Para la determinación de RTCHL, se transfiere la membrana a la superficie del Agar-Agar Glucosado de Sabouraud. Invertir las placas e incubar. Efectuar el recuento de UFC g/mL (Figura 1).

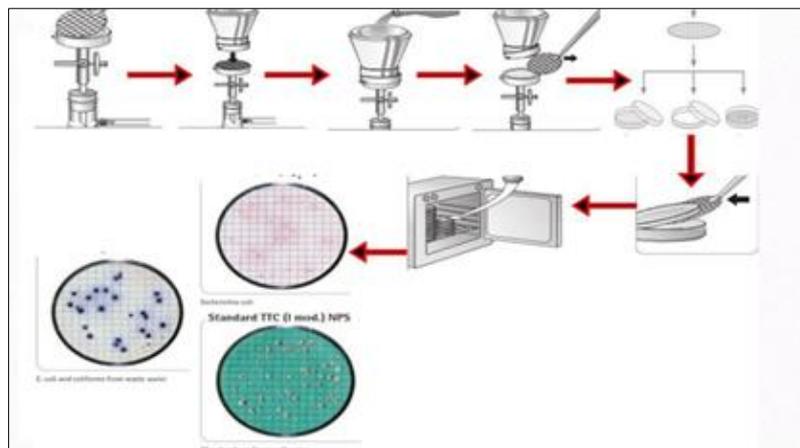


Figura 1: Filtración por membrana

**2- Recuento en Placa** Este método es el más recomendado para estimar el número de microorganismos presentes en la muestra.

#### a) Vertido en placa

Transferir a una placa de Petri estéril 1 mL de la muestra preparada y 15 a 20 mL del Agar Digerido de Caseína-Soja o Agar-agar glucosado de Sabouraud previamente fundido y enfriado a 45°C.

Tapar la placa y homogenizar por rotación. Dejar solidificar a temperatura ambiente. Luego incubar colocando las placas invertidas a 30°C a 35°C durante 3 días. Para hongos y levaduras se incuba sin invertir entre 20°C a 25°C durante 5 días. Luego de la incubación examinar las placas para ver si hubo desarrollo.

### b) Extensión en superficie

Colocar a cada placa 15-20 mL de Agar Digerido de Caseína-Soja o de Agar-Agar Glucosado de Sabouraud a 45 °C y dejar que solidifique. Adicionar 0,1 mL de la muestra preparada y extender sobre la superficie del medio con una espátula de Drigalski. Incubar colocando las placas invertidas a 30°C a 35°C durante 3 días. Para hongos y levaduras se incuba sin invertir entre 20°C a 25°C durante 5 días. Luego de la incubación examinar las placas para ver si hubo desarrollo.

### 3- Método del Número Más Probable (NMP)

Este método se utiliza para medicamentos que presentan una carga microbiana muy baja o no se dispone de ningún otro método de enumeración.

Preparar 3 diluciones seriadas de la muestra (1/10; 1/100; 1/1000) a partir de cada nivel de dilución tomar 1 mL y sembrar en un tubo conteniendo 9 mL de Caldo Digerido Caseína-Soja. Realizar este procedimiento por triplicado para cada nivel de dilución. Incubar todos los tubos entre 30-35 °C no más de 3 días. Luego del periodo de incubación examinar los tubos para detectar turbidez.

Para cada nivel de dilución anotar el número de tubos que presentan crecimiento microbiano (Figura 2). Comparar los resultados de los tubos con la Tabla 4 para determinar el NMP g o mL de muestra.



Figura 2: Método del Número Más Probable (NMP), ejemplo de determinación de NMP de coliformes totales.

**Tabla 4.** Número más probable de microorganismos (NMP /g o mL). Procedimiento en tubo.

N° de tubos positivos			NMP de microorg anismos por g o mL	Límite de confianza 95%
0,1 g	0,01 g	0,001 g		
0	0	0	< 3	0-9,4
0	1	0	3	0,1-10
1	0	0	3,6	0,2-17
1	0	1	7,2	1,2-17
1	1	0	7,4	1,3-20
1	2	0	11	4-35
2	0	0	9,2	1,5-35
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>4-35</b>
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	2	0	21	5-40
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980
3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	>1100	

## CONSERVANTES

Son agentes que inhiben el crecimiento de microorganismos capaces de causar deterioro biológico de sustancias o materiales.

La presencia de conservadores en un producto puede ejercer un efecto inhibitor del crecimiento microbiano, por lo tanto, se requiere su neutralización o remoción. Algunos ejemplos:

**Tabla 5. Ejemplos de conservantes**

Conservantes	Función	Ejemplos
Parabenos 0,25 %, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico 0,05%	Antifúngicos	Preparaciones líquidas, orales, tópicas y semisólidas
Cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol clorobutanol, alcohol bencílico, etc.	Antimicrobianos	Preparaciones líquidas, orales, tópicas y semisólidas
Ácido ascórbico, BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), bisulfito de sodio, etc.	Antioxidantes	Preparaciones inyectables, oftálmicas, capsulas, comprimidos, suplementos dietéticos, productos cosméticos, etc.
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), etc.	Quelantes o secuestrantes	Preparaciones inyectables, oftálmicas, colirios, cremas, lociones, jarabes, suspensiones, etc.

**Tabla 6. Agentes neutralizantes de componentes con acción inhibitoria del desarrollo microbiano**

Conservante	Neutralizante recomendado
-------------	---------------------------

Compuestos de amonio cuaternario	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Clorhexidina	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Halógenos: Hipocloritos; Cloraminas Iodo-povidona	Tiosulfato de sodio 0.05%
Agentes quelantes EDTA	Dilución 1/10 a 35 °C
Aldehídos	Dilución Bisulfito de sodio 6% Suero 0.5%
Fenoles	Dilución 1/50 Tween 20 u 80 hasta 10%
Compuestos mercuriales	Tioglicolato de sodio 0.05 al 0.1% Caldo tioglicolato