

**Guía de trabajos prácticos  
Cátedra de Microbiología e Inmunología**

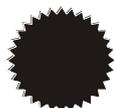
**Parte II**

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

**UNaM**

**Gladis Jerke  
Marta A.Horianski  
Martha G.Medvedeff**

**2009**



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

**San Luis 1870**

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

**Coordinación de la edición:** Claudio Oscar Zalazar

**Armado de interiores:** Amelia E. Morgenstern

**Corrección:** Amelia E. Morgenstern

ISBN 978-950-579-136-1

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Medvedeff, Martha

Guía de trabajos prácticos, Cátedra de Microbiología e Inmunología: Parte II.  
- 1a ed. - Posadas: EDUNaM - Editorial Universitaria de la Universidad  
Nacional de Misiones, 2009.

102 p.; 30x21 cm.

ISBN 978-950-579-136-1

1. Microbiología. 2. Parasitología. 3. Enseñanza Superior. I. Título

CDD 579.071 1

Fecha de catalogación: 26/08/2009.

## **ÍNDICE**

|  |    |
|--|----|
| <b>Trabajo Práctico N° 11</b> .....  | 5  |
| Anaerobios   |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 12</b> .....  | 12 |
| Antimicrobianos I. Sensibilidad bacteriana                                   |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 13</b> .....  | 20 |
| Antimicrobianos II. Resistencia bacteriana. Detección de $\beta$ -lactamasas |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 14</b> .....  | 29 |
| Métodos de recuento microbiano I   |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 15</b> .....  | 39 |
| Métodos de recuento microbiano II  |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 16</b> .....  | 42 |
| Curva de crecimiento microbiano  |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 17</b> .....  | 45 |
| Control microbiológico ambiental   |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 18</b> .....  | 50 |
| Micología  |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 19</b> .....  | 61 |
| Técnicas inmunológicas   |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 20</b> .....  | 80 |
| Virología y cultivo celular  |    |
| <b>Trabajo Práctico N° 21</b> .....  | 87 |
| Parasitología  |    |
| <b>Anexos</b>  |    |
| Anexo N° 1. Trabajo Práctico N° 11.....                                      | 96 |
| Anexo N° 2. Trabajo Práctico N° 12.....                                      | 97 |
| Anexo N° 3. Trabajo Práctico N° 14.....                                      | 99 |



## Trabajo Práctico N° 11

### ANAEROBIOS

#### Objetivos

- *Desarrollo de microorganismos con diferentes requerimientos de oxígeno en medios líquidos y agarizados empleando diferentes atmósferas de incubación.*
- *Conocer y discutir ventajas y desventajas de los diferentes métodos para generar atmósferas anaeróbicas.*

#### Introducción

Los anaerobios generalmente poseen un metabolismo de tipo fermentativo en el cual sustancias orgánicas son los aceptores finales de electrones. Las formas vegetativas mueren cuando son expuestas al O<sub>2</sub> molecular libre en la atmósfera, aunque el grado de resistencia bajo estas condiciones es variable (AEROTOLERANCIA); los esporos bacterianos no son afectados por tratarse de formas biológicas metabólicamente inertes y con muy escasa proporción de agua en su composición.

Anaerobios son aquellos gérmenes que solo pueden desarrollarse en ausencia de cantidades significativas de oxígeno (O<sub>2</sub>) y bajo condiciones de potenciales REDOX (Eh) muy reducidos, (ver Anexo N° 1).

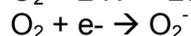
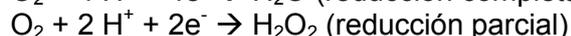
Los procesos de generación de energía en bacterias incluyen la respiración, la fermentación y la fotosíntesis. La respiración es un proceso que puede ser aeróbico o anaeróbico, siendo en el primer caso el O<sub>2</sub> el aceptor final de electrones, y en el segundo caso, un compuesto inorgánico tal como nitrito, sulfato o carbonato. La fermentación es un proceso menos eficiente que la respiración para extraer energía. Cuando los microorganismos oxidan la glucosa se libera toda la energía disponible en la molécula de glucosa. Los microorganismos que realizan procesos fermentativos por lo general son anaerobios obligados o anaerobios facultativos.

Entre los microorganismos que presentan respiración aerobia se encuentran los aerobios obligados y los anaerobios facultativos (Tabla 11.1). Además, algunos de los anaerobios facultativos pueden emplear nitrato como aceptor final de electrones. Sin embargo, los que emplean sulfato o carbonato como aceptor de electrones en una respiración anaerobia son anaerobios obligados.

#### El metabolismo de los anaerobios - Oxígeno sensibilidad

Los anaerobios estrictos crecen y se multiplican en ausencia total de oxígeno molecular, logrando obtener energía y sintetizar todos sus componentes estructurales sin la ayuda del O<sub>2</sub>. Todos sabemos que la vía anaeróbica posee un menor rendimiento energético y está sujeta a potenciales REDOX bajos y sin la presencia de elementos que interfieran el flujo normal de electrones.

Si bien el O<sub>2</sub> es potencialmente tóxico para cualquier forma de vida, los anaerobios son intolerantes al mismo aunque en diferentes grados. Existe un espectro que va desde los extremadamente intolerantes (aerointolerantes) hasta los aerotolerantes moderados los cuales pueden sobrevivir a la presencia de O<sub>2</sub> durante breves períodos. Varias son las causas de la oxígeno toxicidad. En 1<sup>er</sup> lugar el oxígeno es un poderoso oxidante, es decir, un ávido receptor de electrones, por lo tanto su presencia en solución es incompatible con potenciales REDOX bajos. En esta situación el flujo de electrones se ve interferido por un receptor extraño al usual de los gérmenes provocando shunts letales. En segundo lugar el oxígeno puede interactuar directamente con enzimas o cofactores causando inactivaciones irreversibles. En tercer lugar, y aparentemente, la causa más importante de la toxicidad se atribuye a la producción de sustancias tóxicas derivadas de la reducción parcial de la molécula O<sub>2</sub>. Simplificando, se pueden dar las siguientes reacciones químicas:



La formación de Peróxidos de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede ser catalizada por varias enzimas y su letalidad para las bacterias está fehacientemente comprobada. Por otra parte, el anión Superóxido ( $O_2^-$ ) es altamente tóxico por su participación en la producción de hidroxilos libres ( $HO^\cdot$ ) agentes letales para los microorganismos. Aquellos anaerobios aerotolerantes poseen enzimas como catalasas y peroxidasas que descomponen los  $H_2O_2$  en  $H_2O + O_2$ ; otros poseen Superóxido-dismutasas (SOD) que actúan eliminando los  $O_2^-$ ; más aun, las SOD han sido postuladas como factores de virulencia en los anaerobios ya que estas enzimas permitirían la sobrevivencia de las bacterias en tejidos oxigenados hasta que el consumo de oxígeno creará el ambiente adecuado para la multiplicación y desarrollo.

No todos los anaerobios poseen relaciones similares con el  $O_2$ , en realidad, forman un espectro continuo, desde los microorganismos que son capaces de crecer, aunque apenas, sobre la superficie de medios sólidos expuestos al aire, hasta los incapaces de crecer si la atmósfera contiene solo 0,03% de  $O_2$ .

**Tabla 11.1.** Clasificación de las bacterias de acuerdo a sus requerimientos de  $O_2$

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

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

#### **Genética de interés en los anaerobios - Elementos extra cromosómicos: Plásmidos.**

Los Plásmidos están ampliamente difundidos entre los anaerobios, especialmente a nivel de especies de *Clostridium* y *Bacteroides*. Un muy buen porcentaje de estos elementos no han demostrado funciones específicas. Entre los Plásmidos funcionalmente conocidos encontramos:

**a. Plásmidos que codifican la producción de Bacteriocinas.** Similares a las Colicinas, estas sustancias las poseen especies de *Clostridium* y *Bacteroides*.

**b. Plásmidos toxigénicos.** Ampliamente distribuidos entre las especies de *Clostridium* productoras de exotoxinas (toxigénicas). La correlación fehaciente entre plásmido y producción de toxina no se ha podido establecer en muchos casos. El caso con más evidencias de la relación plásmido-toxina es para *Clostridium tetanii*, donde puede afirmarse que la producción genética de toxina tetánica está codificada por un Plásmido.

**c. Plásmidos que codifican la resistencia a los ATB.** Existen evidencias de que entre diferentes especies de *Clostridium*, *Bacteroides* y cocos anaerobios existen plásmidos de diferente tamaño que codifican la resistencia a Macrólidos, Clindamicina, Eritromicina, Tetraciclinas y Cloramfenicol.

## Sistemas de incubación en anaerobiosis

Su elección viene determinada por el costo, número de cultivos y limitaciones de espacio.

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

Los cultivos incluyen el uso de Jarras anaeróbicas, bolsas plásticas, método PRAS (medios líquidos prerreducidos antes de esterilizar) y la Cámara de anaerobiosis o "cámara de guantes". Los dos últimos métodos son muy caros, requieren equipamiento complejo, son lentos y se usan para estudios de Flora Normal (ver Anexo N° 1) 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.

## Medios líquidos

1. *Hemocultivos*. Se emplean para el cultivo de sangre en la investigación de microorganismos de importancia clínica. Contienen (SPS) sodium polyanetol sulfonate que estimula el desarrollo de los anaerobios. Se trata de frascos de 100 ml, al vacío, con el agregado de CO<sub>2</sub>, una base nutritiva (digerido triptico de soja o peptonas) y un agente reductor (thiol o tioglicolato). El porcentaje de sangre a inocular es del 5 al 10% v/v. Los frascos se examinan diariamente buscando turbidez, hemólisis o gas; se consideran negativos definitivamente a los 10 días de incubación, previo a un subcultivo final.

2. Se pueden utilizar otros medios de cultivo líquidos, tales como caldo tioglicolato, caldo de arvejas, caldo sangre para anaerobiosis, caldo ICC, suplementado con extracto de levaduras, caldo thiol, caldo carne suplementado, etc. Previo a su inoculación debe extraerse el O<sub>2</sub> de los medios de cultivo estériles, lo cual se realiza por calentamiento. Como el O<sub>2</sub> es menos soluble en agua caliente que en fría, es suficiente colocar a los tubos conteniendo medio de cultivo en un baño de agua hirviendo durante 15 a 20 minutos, y luego introducirlos en agua fría rápidamente sin agitar. De esta manera se elimina el O<sub>2</sub> de los medios de cultivo. Después de sembrados los tubos se cubren con una capa de vaselina o parafina estériles (líquidas) para protegerse de la acción del O<sub>2</sub> del aire.

## Jarras de Anaerobiosis

Existen varias marcas comerciales de jarras con performance aceptable para generar atmósfera de anaerobiosis. El sistema más utilizado es el GasPak (Figura 11.1). Es el mejor método para el cultivo de bacterias anaerobias, permite utilizar medios líquidos o solidificables en profundidad o superficie en tubos o en cajas de Petri.

El fundamento del sistema GasPak se basa en:

1. La generación de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por medio de una reacción química, cuyos sustratos se encuentran separados en un sobre al cual se le agrega agua, desencadenando la reacción.
2. La combinación del H<sub>2</sub> y el O del aire para formar agua generan la anaerobiosis. 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 Na. 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.

## Metodología

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.

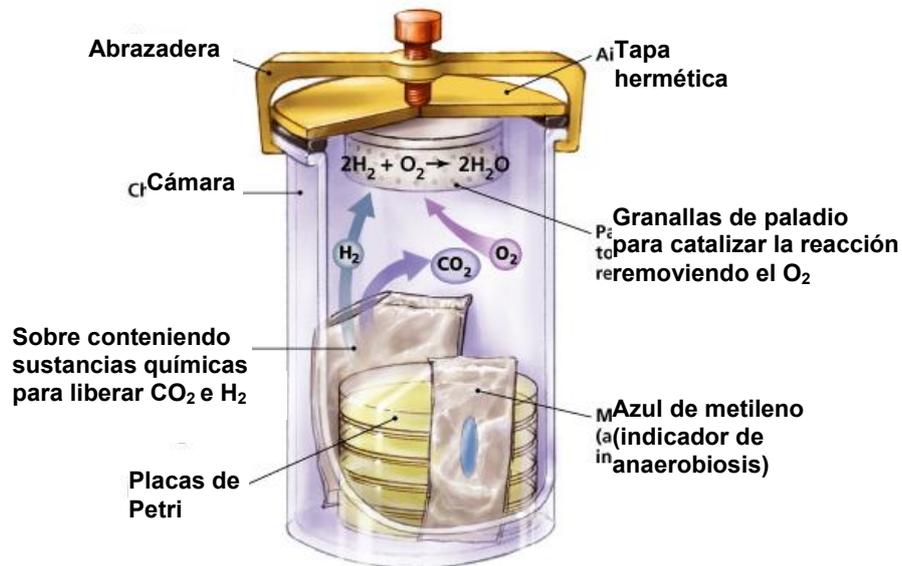


Figura 11.1. Sistema anaeróbico GasPak.

### Sobres de Anaerobiosis

El sistema BioBag consiste en una bolsa plástica transparente, impermeable a gases, una ampolla de indicador de anaerobiosis (resazurina) y una ampolla generadora de anaerobiosis. Una o 2 placas de Petri pueden introducirse antes de sellar la bolsa mediante un sellador plástico por calor. Luego se rompen las ampollas de indicador y generador. Los gérmenes crecen y se mantienen viables por lo menos una semana. Este sistema tiene las ventajas de su economía y practicidad.

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

### Recolección de las muestras

La toma de muestra idealmente debe realizarse en el laboratorio, evitándose al máximo el contacto con el O<sub>2</sub> de los gérmenes supuestamente presentes en el material, lo que implica el rápido procesamiento del mismo. El tener que transportar la muestra es un factor fundamental que afecta el éxito final de los cultivos para anaerobios. Las bacterias deben ser protegidas de los efectos letales del O<sub>2</sub> desde el momento de la obtención de la muestra hasta que es colocada en un medio ideal para anaerobios. Deben procesarse dentro de las 2 horas de obtenidas.

Los métodos para la toma de muestras y transporte más utilizados son:

A) *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.

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

### Procesamiento de las muestras

A) *Examen macroscópico*: anotar características macroscópicas y caracteres organolépticos de las muestras examinadas.

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

C) *Cultivo*: el metabolismo anaerobio es mucho menos eficiente que el aerobio para obtener energía, por lo tanto los medios de cultivo tienden a ser mucho más ricos que los de uso común para aerobios y facultativos. Además, se requiere una incubación más prolongada usándose 2 a 10 días para su aislamiento. Por lo general, los medios de cultivo para anaerobios requieren la incorporación de sustancias reductoras como el clorhidrato de cisteína y tioglicolato de sodio (ver guía de Trabajos Prácticos N° 6). 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 el medio caldo de arvejas para reactivación de esporas, utilizando vaselina para conservar atmósfera de anaerobiosis.

2) *Medios Sólidos*: pueden utilizarse:

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

- Agar Brucella o agar ICC, adicionado con un aminoglucósido para inhibir el desarrollo de microorganismos 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.

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

## Desarrollo Práctico N° 11

### Consignas

1. Siembra en medio líquido para determinar el tipo respiratorio.
2. Siembra en medio sólido: siembra en profundidad y en superficie.

### Materiales necesarios

- Asa de siembra
- Mecheros
- Medios de cultivo (según la técnica utilizada)
- Vaselina estéril
- Jarra de anaerobiosis
- Suspensión de microorganismos: *Clostridium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

### Actividades

#### a) Siembra en profundidad

*En tubo con medio líquido:* se utiliza medio fluido de tioglicolato, que debe ser hervido en un baño María durante 15 o 20 minutos, antes de ser inoculado, para eliminar el oxígeno disuelto. Sembrar el medio, una vez atemperado a 45 - 50°C. Con el asa de siembra o con una pipeta Pasteur estéril con el extremo cerrado, se realiza un movimiento en espiral de arriba a abajo y de abajo a arriba, para distribuir la muestra homogéneamente, sin agitar el tubo durante la siembra para evitar la entrada de aire. Agregar una capa de parafina estéril para impedir la difusión del O<sub>2</sub> al medio. Incubar en estufa durante 24 - 48 horas a 35 - 37°C.

*En placa con medio sólido:* transferir 1 ml del inóculo a una placa de Petri estéril vacía y añadir el medio de cultivo fundido y atemperado a 45 - 50°C, homogeneizando mediante giros repetidos de la placa hasta que el inóculo se haya distribuido uniformemente. Una vez solidificado el agar, añadir una segunda capa de medio de cultivo.

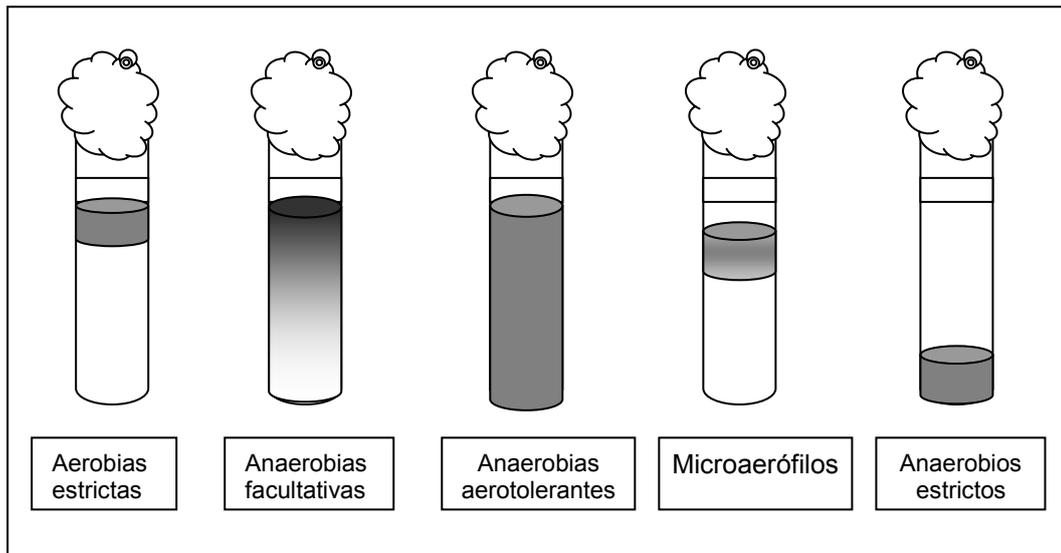
#### b) Siembra en superficie

*Estría múltiple:* la siembra por estría en superficie también puede hacerse con microorganismos anaerobios, pero, en este caso, las placas no se llevan a incubar directamente, sino que se introducen en una jarra especial en la que exista un ambiente libre de oxígeno, denominada jarra de anaerobiosis. Incubar las placas dentro de la jarra de anaerobiosis durante 48 horas a la temperatura más adecuada.

### Resultados

a) En medio líquido (tioglicolato): los microorganismos pueden crecer en la parte superior del medio si son aerobios estrictos, en la zona inferior del medio si son anaerobios estrictos y a lo largo de todo el medio, en el caso de anaerobios aerotolerantes. Los anaerobios facultativos crecerán también por todo el tubo, aunque preferentemente en superficie. Por último, si se trata de microorganismos microaerófilos, aparecerá crecimiento en una pequeña zona intermedia, próxima a la superficie (Figura 11.2).

b) Estría múltiple en superficie observar el crecimiento, teniendo en cuenta que la placa ha sido incubada en ambiente de anaerobiosis. En las zonas donde se hayan obtenido colonias aisladas estudiar su morfología.



**Figura 11.2.** Relación de las bacterias con el oxígeno.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rivas. Anaerobios. En: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2026.pdf>
- Guía de Prácticas de Microbiología. 3º Curso. Departamento de Microbiología II. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Práctica N° 7. Cultivo de Anaerobios. 2004/2005.
- Alcalá, L.; Betriú, C.; García Sánchez, J. E. Bacterias Anaerobias de Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2004.
- Von Specht, M.; Ibarra, L.; Jerke, G. Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología Carrera de Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Trabajo Práctico 7. Siembra, aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios. 2007.
- Koneman, Elmer y cols. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana. 1983.
- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7º Edición. Editorial Panamericana. 1983.

## Trabajo Práctico N° 12

### ANTIMICROBIANOS I. SENSIBILIDAD BACTERIANA

#### Objetivos

- Conocer diferentes métodos para evaluar "in vitro" la sensibilidad bacteriana frente a antimicrobianos.
- Evaluar la sensibilidad o resistencia a diversos antimicrobianos de bacterias de crecimiento rápido empleando el método de difusión estándar (Kirby Bauer).
- Lectura e interpretación de los halos de sensibilidad, estableciendo categorías de sensible, intermedio y resistente de acuerdo a los puntos de corte establecidos por la NCCLS.

#### Introducción

La búsqueda de medicamentos efectivos para el tratamiento de los procesos infecciosos data de mucho tiempo atrás. Se estudiaron numerosas sustancias hasta el descubrimiento de los antibióticos. La aparición de los primeros agentes con toxicidad selectiva contra las bacterias, sin provocar daños en el huésped, revolucionó el tratamiento de las infecciones.

**Agentes antimicrobianos:** sustancias químicas sintetizadas total o parcialmente en el laboratorio que son capaces de matar y/o inhibir el crecimiento de microorganismos.

**Antibióticos:** sustancias químicas sintetizadas por microorganismos que poseen acción antimicrobiana.

Tres grupos de microorganismos son los responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos usados en medicina:

- 1) Hongos (especialmente *Penicillium*) que producen antibióticos como la penicilina y la griseofulvina.
- 2) Bacterias (del género *Bacillus*) de las que se obtienen antibióticos como la bacitracina y la polimixina.
- 3) Actinomicetos (del género *Streptomyces*) que fabrican antibióticos como la estreptomina, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina.

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

En realidad, solo los antimicrobianos del grupo de las penicilinas actúan exclusivamente contra las bacterias, mientras que los demás antimicrobianos interfieren sobre los procesos metabólicos tanto del huésped como de las bacterias. La razón por la cual las bacterias son las preferentemente afectadas reside en el hecho de que los procesos metabólicos microbianos son más rápidos que los observados en las células del huésped.

A nivel celular, la acción de los antimicrobianos sobre las bacterias se ejerce por uno de los cinco mecanismos siguientes:

- 1) Inhibición de la síntesis de la **pared** celular. Ejemplo: Penicilinas, Cefalosporina, Cicloserina.
- 2) Alteración de la permeabilidad de la **membrana** celular. Ejemplo: Polimixina, Imidazoles.
- 3) Inhibición de la síntesis de **DNA**. Ejemplo: Quinolonas, Ácido Nalidixico y Ciprofloxacina.
- 4) Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (**ribosomas**). Ejemplo: Aminoglucósidos, Cloranfenicol, Tetraciclina.
- 5) Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana (**PABA**, ácido paraaminobenzoico). Ejemplo: Sulfonamidas, Trimetoprim, Isoniazidas.

#### Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Evalúan la capacidad de un fármaco antibacteriano para inhibir *in vitro* el desarrollo bacteriano. Esta capacidad puede determinarse por el:

- Método de dilución.
- Método de difusión.

Cada método tiene sus ventajas y limitaciones.

**Método de dilución:** es uno de los primeros que se llevó a cabo y aún hoy sirve como método de referencia porque permite la determinación cuantitativa de la sensibilidad al antibiótico, pero es laborioso y costoso, por lo tanto se limita su uso a casos especiales. Para llevarlo a cabo se debe agregar las diluciones de un antibiótico a un caldo (*metodología de dilución en caldo*) o un medio de agar (*metodología de dilución en agar*) en el que luego se siembra el microorganismo problema. La concentración más baja que impide el crecimiento bacteriano después de 16 a 18 horas de incubación se considera la “concentración inhibitoria mínima” o CIM del fármaco.

**Método de difusión:** es más accesible y de uso común en los laboratorios de diagnóstico clínico.

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

### Indicaciones para la realización de pruebas de sensibilidad

Cualquier prueba de sensibilidad se indica para todo microorganismo causante de un proceso infeccioso cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación y que pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Rara vez se realizan pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, por ejemplo *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* que han mantenido invariable su sensibilidad a la penicilina (Tabla 12.1). En el caso que el paciente sea alérgico a la penicilina, puede probarse la sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos.

**Tabla 12.1.** Perfiles de resistencia natural a algunas especies bacterianas.

| Especie bacteriana   | Resistencia natural a:       |
|--|------------------------------|
| <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Hafnia alves</i> , <i>Enterobacter</i> spp. | CTN, CXT                     |
| <i>Enterobacter cloacae</i>  | AMP, CTN, CXT                |
| <i>Edwardsiella tarda</i>  | COL                          |
| <i>Klebsiella</i> spp  | AMP, CAR                     |
| <i>Morganella morganii</i>   | AMP, CTN, COL                |
| <i>Proteus mirabilli</i>   | COL, NIT, TET                |
| <i>Proteus vulgaris</i>  | AMP, AMC, CTN, COL, NIT      |
| <i>Serratia</i> spp  | CTN, COL, CXM                |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>   | AMP, CAR                     |
| <i>Flavobacterium</i> spp.   | CTN, COL, TOB, AKN           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | CTN, CXT, CMA, CXM, TMS, CTX |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>  | GEN                          |

Referencias. AMP: ampicilina, CTN: cefalotina, COL: colistin, CXT: cefoxitina, CAR: carbenicilina, NIT: nitrofurantina, TET: tetraciclina, AMC amoxicilina clavulánico, CMP: cloranfenicol, CXM cefuroxima, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, TMS: trimetoprima/sulfametoxazol, CTX: cefotaxima. CMA: cefamandol.

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

- Se tiene mezcla de microorganismos.
- Se aísla flora habitual.
- La naturaleza de la infección no es clara.
- El microorganismo no tiene relación con el proceso a ser tratado.
- Sobre el material clínico sin procesar (excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un solo patógeno. Se debe repetir utilizando la metodología estandarizada).

### Pruebas de sensibilidad por difusión en agar

El método de difusión conocido como "Método de la OMS" no difiere sustancialmente del conocido "Kirby-Bauer" recomendado por la NCCLS (Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos). Este es el método descrito de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio.

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) aplicados sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará así por difusión un gradiente de concentración del antimicrobiano (Figura 12.1) y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento (halo) alrededor del reservorio (Figura 12.2). El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura, de la velocidad de duplicación bacteriana y del tamaño y fase de crecimiento del inóculo.

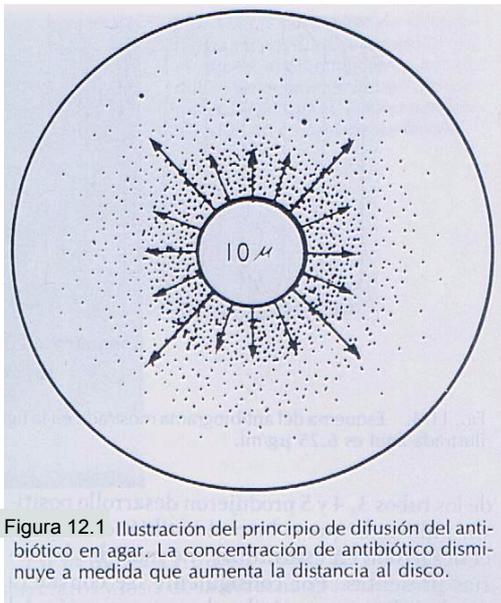


Figura 12.1 Ilustración del principio de difusión del antibiótico en agar. La concentración de antibiótico disminuye a medida que aumenta la distancia al disco.

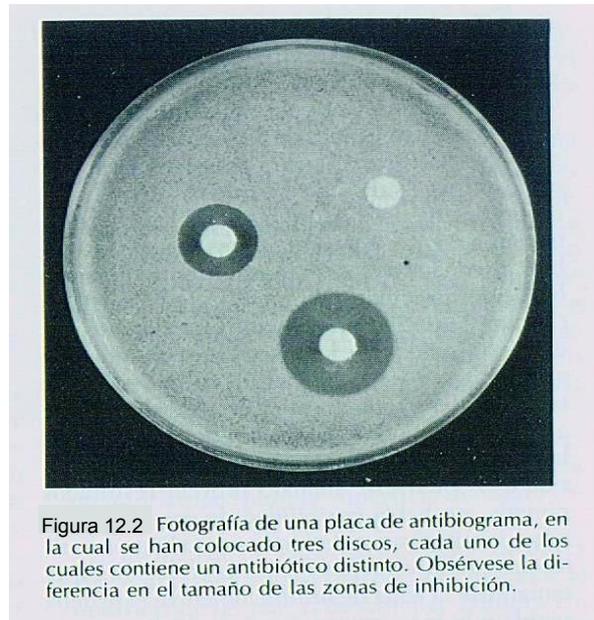


Figura 12.2 Fotografía de una placa de antibiograma, en la cual se han colocado tres discos, cada uno de los cuales contiene un antibiótico distinto. Obsérvese la diferencia en el tamaño de las zonas de inhibición.

#### - ¿A qué microorganismos realizar las pruebas de sensibilidad?

El método de difusión descrito ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, donde incluyen *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*.

Esta técnica no se ha desarrollado para organismos que requieren medios o atmósferas de incubación diferentes.

#### - ¿Qué antimicrobianos usar?

Todos los antibióticos deberán usarse por su nombre genérico.

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

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

#### Estandarización del método

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados. Se deben estandarizar:

- 1- Los discos con antibióticos: espesor y diámetro. Concentración del antimicrobiano.
- 2- El medio de cultivo: Agar Mueller Hinton (altura del medio).
- 3- El inóculo: cultivo joven, densidad de microorganismos ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), preparación reciente.
- 4- La colocación de los discos: tiempo de colocación luego de la siembra, distancia entre discos y número por placa.
- 5- Temperatura y tiempo de incubación: 35 a 37°C durante 18 a 24 horas.

### Técnica de Kirby - Bauer

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

El agar Müller Hinton es el más indicado porque:

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

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

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

*Conservación:* las placas así preparadas y envueltas pueden conservarse entre 4 y 8°C de 4 a 7 días.

**Preparación del inóculo:** se toman 4 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología de la placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación, con un ansa y se introducen en 5 ml de caldo tripteína Soya. Si la turbidez obtenida es la adecuada, no es necesario una incubación posterior, caso contrario, se incuba a 37°C hasta lograr la turbidez del testigo, la que termina de ajustarse agregando solución fisiológica si es necesario.

El testigo a usar corresponde al 0,5 de la escala de Mc Farland, que se logra con la siguiente fórmula: 0,5 ml  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  0,048 M (1,175% P/ V  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  2  $\text{H}_2\text{O}$ ) + 99,5 ml  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,36 N (1% V/V).

El inóculo también puede ser preparado de igual manera empleando solución fisiológica. La suspensión debe ser ajustada inmediatamente a la escala de Mc Farland, sin incubación previa.

**Siembra de las placas:** se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo, oprimiendo el algodón contra las paredes internas del tubo para descartar el exceso de líquido. Se aplica el hisopo sobre la superficie de las placas estriando uniformemente y rotando la placa cada 60°. Es importante la aplicación homogénea del inóculo en la superficie del agar dado que una aplicación deficiente conducirá a la obtención de halos de inhibición con bordes poco nítidos y mediciones poco precisas (Figura 12.3). Se seca unos 5 minutos antes de aplicar los discos.

Los discos deben reunir las siguientes condiciones:

- Un diámetro de 6 mm.
- No vencidos.
- Debidamente refrigerados y protegidos de exceso de humedad durante su almacenamiento.

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

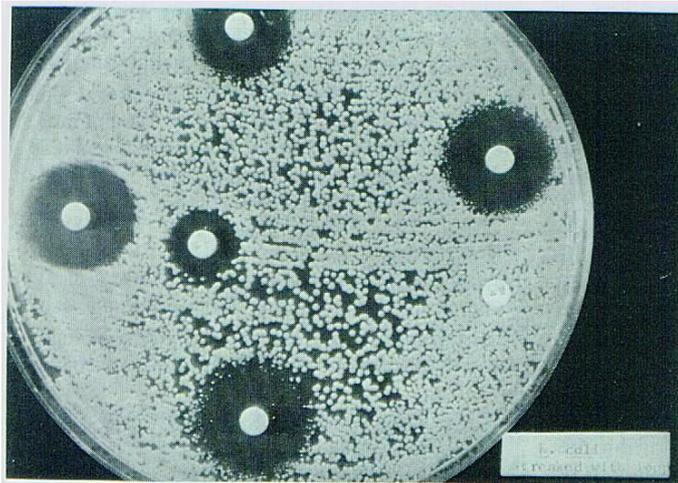


Figura 12.3 Fotografía de una placa de antibiograma deficientemente inoculada que muestra un desarrollo irregular. Los bordes de las zonas de inhibición no son nítidos, impidiendo mediciones exactas.

**Colocación de los discos:** esperar entre 3 a 5 minutos y no más de 15 minutos antes de aplicar los discos, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Colocar los discos con una pinza estéril cuidando que tengan un buen contacto con la superficie del agar haciendo una ligera presión. Debe respetarse la distancia entre los discos para evitar superposición de zonas. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa y a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro (Figura 12.4). En placas de 100 mm de diámetro no deben colocarse más de 6 discos. Si se excede su número, puede que ocurra superposición de halos, lo que se dificulta la lectura y pueden darse fenómenos de sinergismo o antagonismo.

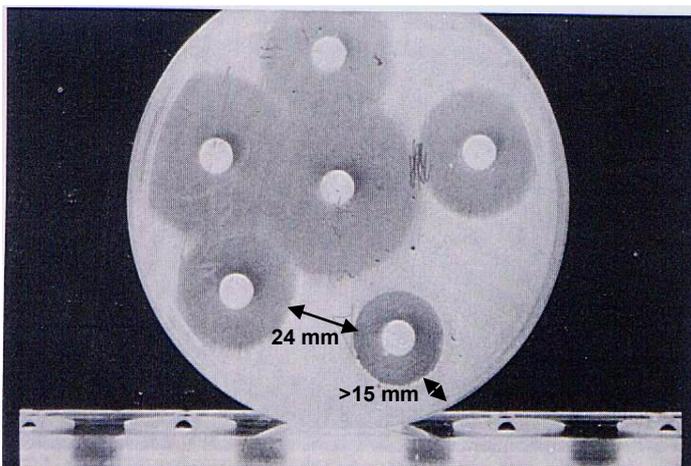


Figura 12.4 Fotografía de una placa de antibiograma deficientemente preparada que muestra una objetiva superposición de las zonas de inhibición de discos adyacentes.

**Incubación de las placas:** incubar las placas invertidas, en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos durante 16 a 18 horas.

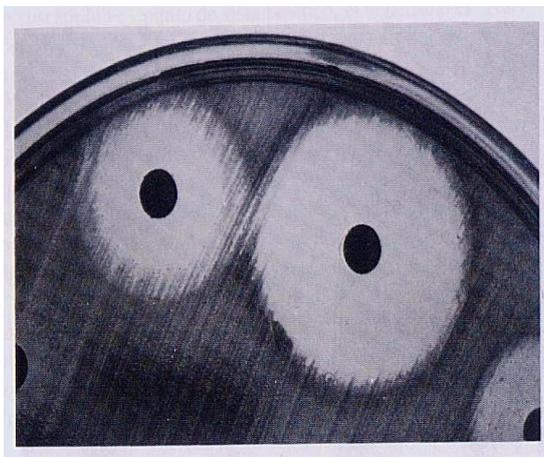
**Medición de las zonas de inhibición:** con una regla o calibre, se mide el diámetro de los halos incluyendo el disco de 6 mm.

Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con desarrollo invasor (*Proteus mirabilis* o *Proteus vulgaris*), se debe ignorar el ligero velo y medir el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente (Figura 12.5). Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no.

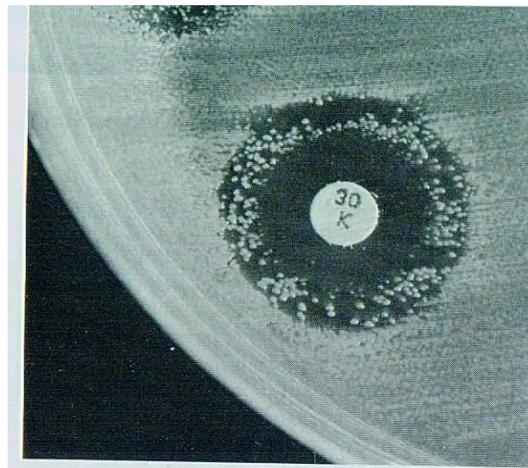
Cuando aparecen colonias aisladas dentro del halo de varios antibióticos con distinto mecanismo de acción, por ejemplo: cloranfenicol, fosfomicina y gentamicina, corresponde a cultivos impuros por fallas en el aislamiento (Figura 12.6). En tal caso se debe efectuar antibiogramas por separado a cada especie.

Cuando las colonias aparecen en un solo antibiótico o en antibióticos muy relacionados (Penicilina y Ampicilina), se debe a bacterias previamente resistentes en la población usada

como inóculo. Es prudente informar como resistente y sugerir la determinación de una CIM o una concentración bactericida mínima (CBM) en caso que se desee administrar el antibiótico en cuestión.



**Figura 12.5.** Fotografía de una placa de antibiograma para una especie de *Proteus*. Obsérvese la invasión del organismo en la zona de inhibición, en los bordes periféricos. Al medir el diámetro de la zona de inhibición se debe tener en cuenta el borde más externo de la misma



**Figura 12.6.** Fotografía de una placa de antibiograma que contiene dos organismos en cultivo mixto. Los organismos que desarrollan dentro de la zona de inhibición son "resistentes" aunque la segunda especie puede ser "sensible". Esta prueba se debe repetir.

**Interpretación de los resultados:** para cada antibiótico ensayado puede concluirse que el germen es **Sensible**, de **Sensibilidad intermedia**, o **Resistente**, cotejando nuestras lecturas con las tablas (ver Anexo N° 2).

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

Estas cepas pueden ser: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, entre otras.

El contenido de timina del medio de Agar Mueller Hinton debe controlarse con discos de Trimetroprima Sulfametoxazol frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### Modificaciones de la técnica de Kirby Bauer

Los métodos de rutina descritos para los microorganismos de crecimiento rápido no son aceptables generalmente para la mayoría de los microorganismos fastidiosos, siendo necesario modificar la técnica. La técnica de difusión por discos modificada es utilizada para microorganismos fastidiosos: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococcus  $\beta$  hemolíticos y del grupo víridans. Otras bacterias fastidiosas deberán ensayarse por el método de la dilución.

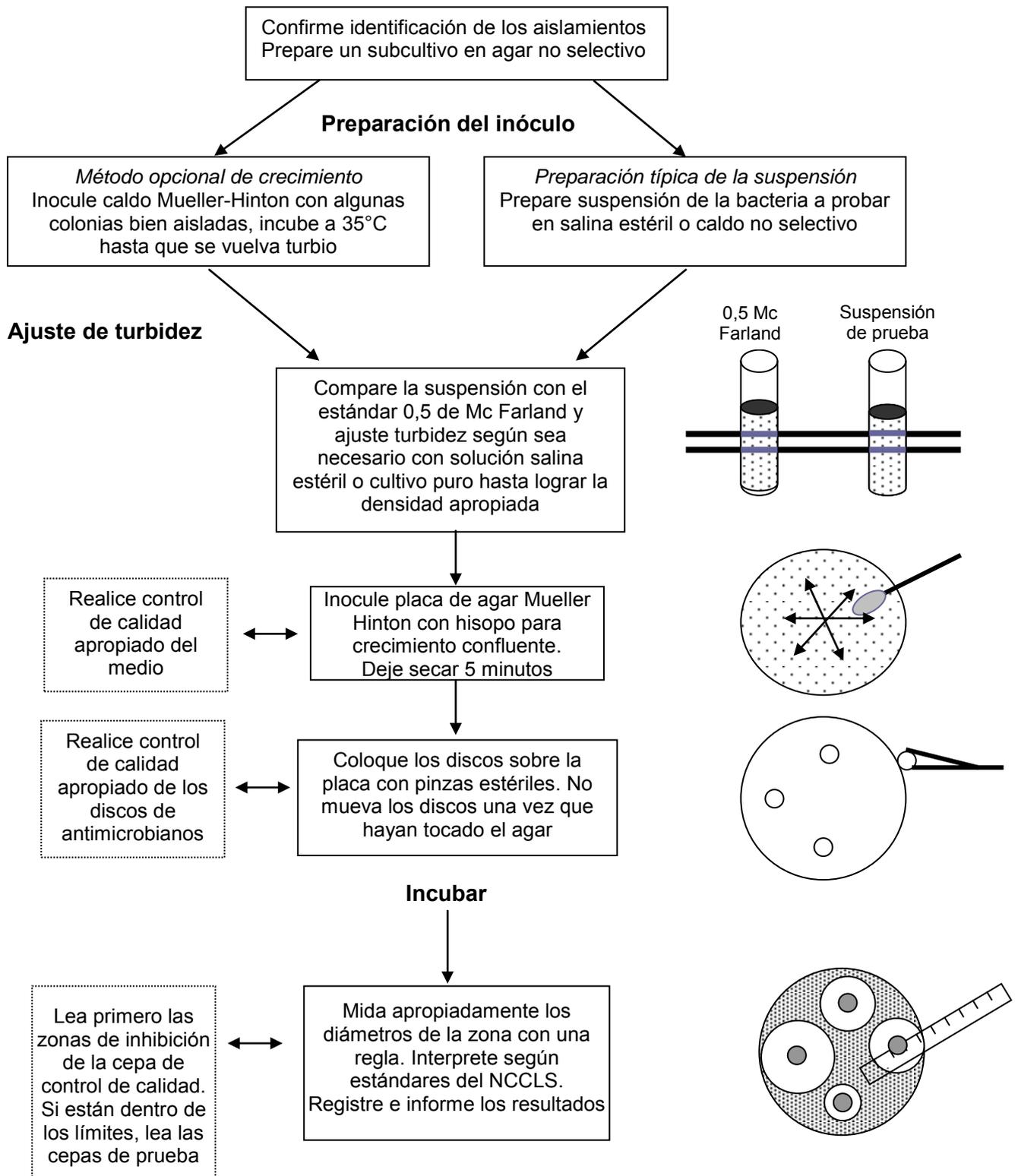
*Haemophilus influenzae*, se utiliza el medio Haemophilus Test Medium (HTM) que contiene: Agar Mueller Hinton, 15  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -NAD, 15  $\mu\text{g/ml}$  de hematina bovina y 5  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de levadura. Ajustar a pH 7,2 – 7,4. Atmósfera de incubación con 5%  $\text{CO}_2$ .

Para *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococcus  $\beta$  hemolíticos y del grupo víridans, se realiza el ensayo en una placa de Agar Sangre incubando en microaerofilia.

*Micobacterias*, el agar de elección es *Lowenstein Jensen* o agar 7H11, hay otros. Recordemos que el tiempo de incubación es prolongado.

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

**Diagrama de flujo del procedimiento general para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco**



(Adaptado del Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo – WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6)

## Desarrollo Práctico N° 12

### Consignas

1. Realizar la prueba de sensibilidad o antibiograma para gérmenes de desarrollo rápido empleando la técnica de Kirby Bauer.
2. Lectura e interpretación de los resultados de acuerdo a las tablas del anexo.

### Materiales necesarios

- Mecheros
- Asa ojal
- Tubos con solución fisiológica estéril
- Placas estériles
- Hisopos estériles
- Medio de cultivo agar Müller Hinton
- Pinzas metálicas
- Reglas
- Discos con antimicrobianos
- Microorganismos de ensayo
- Patrón de turbidez (sn BaCl<sub>2</sub>)

### Actividades

1. Fundir el medio, enfriar a 50°C y distribuir en placas de Petri hasta una altura de 4 mm (25 a 30 ml para placas de 9 cm).
2. Dejar solidificar y secar en la estufa de cultivo a 35°C (si hay exceso de humedad en la superficie del agar), colocando las placas abiertas invertidas de 10 a 30 minutos.
3. Preparar una suspensión del microorganismo en estudio, en caldo o SF estéril con una turbidez comparable al estándar (0,5 de Mac Farland).
4. Dentro de los 15 minutos de ajustada la turbidez, sumergir el hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo contra la pared del tubo para remover el exceso de inóculo.
5. Sembrar en superficie diseminando el inóculo (con el hisopo) sobre el agar MH. Repetir este procedimiento rotando 60° la placa cada vez, para asegurar una distribución uniforme.
6. Esperar entre 3 y 5 min. y colocar los discos.
7. Incubar a 35°C durante 16 a 18 horas.

Es conveniente realizar también este procedimiento con una cepa patrón para controlar los discos.

### Resultados

Verificar la sensibilidad de los microorganismos frente a los distintos antibióticos, midiendo con una regla el diámetro de la zona de inhibición completa incluyendo el diámetro del disco y comparando con la tabla estándar (Anexo N° 2). De acuerdo a los resultados obtenidos se realizará el informe.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman, E. y cols. Diagnóstico microbiológico. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Ed. Méd. Panamericana. 1983.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. 7<sup>th</sup> ed. Approved standard M2-A7 (MS100-S10) NCCLS, Wayne, Pa, 2000.
- Microbiología clínica. Curso de Microbiología Clínica. Mód. 4. Antimicrobianos. Asociación Argentina de Microbiología, Colegio Bqco. E.R. Fac. Bqca. y Cs. Biol. Univ. Nac. del Litoral.
- Curso básico y avanzado de antibióticos. Cátedra de Bacteriología. Carrera de Bioquímica. Departamento de Microbiología. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. 2002.

## Trabajo Práctico N° 13

### ANTIMICROBIANOS II. RESISTENCIA BACTERIANA.

#### DETECCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS

#### Objetivos

- *Conocer diferentes métodos para detección de mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos  $\beta$ -lactámicos "in vitro".*
- *Identificar fenotípicamente  $\beta$ -lactamasas producidas por bacilos gram negativos empleando los métodos de Jarlier y Sanders.*
- *Lectura e interpretación de los resultados.*

#### Introducción

El descubrimiento y mejora de los antibióticos, como así también la síntesis de quimioterápicos artificiales, han supuesto en este siglo una auténtica revolución médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos les ha llevado a desarrollar mecanismos que los protegen frente a la acción de muchos fármacos.

Se ha demostrado que todos los microorganismos patógenos presentan resistencia a algún antimicrobiano y virtualmente no se conoce ningún antibiótico que se encuentre totalmente exento de ella, representando un reflejo de la presión selectiva por los fármacos antimicrobianos de uso habitual.

#### Bases genéticas de la resistencia

Una de las aplicaciones prácticas más interesantes de los avances realizados en las últimas décadas, en el campo de la genética bacteriana, ha sido comprender los mecanismos genético-moleculares de la resistencia a antibióticos, lo que ha permitido un "ataque" más racional a este problema clínico. Una cepa bacteriana puede volverse resistente a un antibiótico por dos tipos principales de mecanismos:

1. Selección de mutantes resistentes: por un cambio microevolutivo debido a una mutación puntual de un par de bases de un nucleótido o por un cambio macroevolutivo debido a un reordenamiento de segmentos de ADN en gran escala en un solo proceso (transposones).
2. Intercambio genético: adquisición de un ADN extraño transportado por plásmidos, bacteriófagos o transposones.

#### Mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia a antibióticos

La actividad de los antimicrobianos puede separarse en una secuencia de tres pasos:

- Los fármacos deben asociarse con las bacterias y atravesar su envoltura.
- Deben ser transportados hacia un sitio de acción intracelular.
- Deben unirse a su blanco específico.

La resistencia a los antimicrobianos puede ocurrir en cualquiera de estos pasos y los mecanismos incluyen:

1. Inactivación enzimática del antibiótico.
2. Disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico.
3. Modificación química de los sitios de ataque intracelular.
4. Alteración de las enzimas "Blanco".
5. Promoción del eflujo de antibiótico.

#### Inactivación enzimática del antibiótico

Este tipo de mecanismo depende en muchos casos de plásmidos R. Los ejemplos típicos son las resistencias a antibióticos tales como:  $\beta$ -Lactámicos, cloranfenicol y aminoglucósidos.

#### Resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos por producción de $\beta$ -lactamasas

La resistencia a estos antibióticos está dada por la producción de enzimas llamadas  $\beta$ -lactamasas, que son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de las Penicilinas, Cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos dando compuestos sin actividad

bacteriana (Figura 13.1). Es importante destacar que la naturaleza de la cadena lateral (grupo acilo R) influye notablemente en la susceptibilidad de rotura del anillo  $\beta$ -lactámico por las  $\beta$ -lactamasas.

### Las $\beta$ -lactamasas se clasifican según

a) *El tipo de antibiótico* sobre el cual actúan:

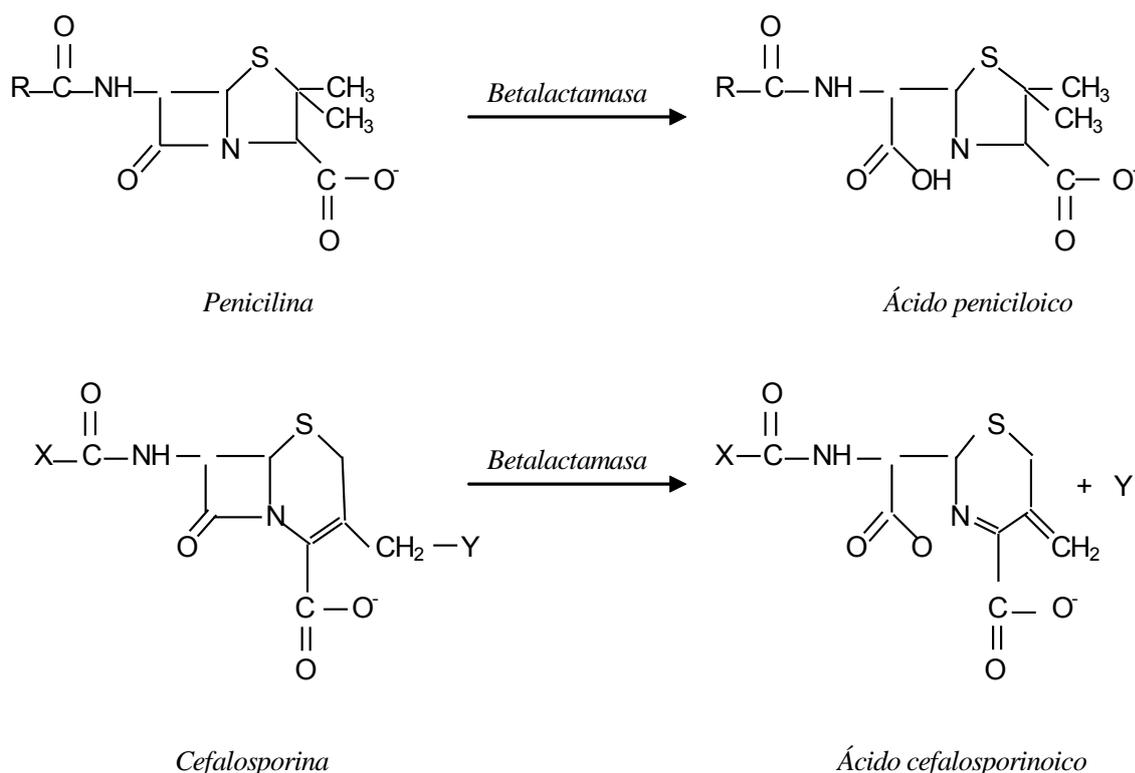
- Cefalosporinasas - prefieren las Cefalosporinas
- Penicilinasas - prefieren las Penicilinas.
- $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) son mediadas por plásmidos y predominan en bacilos Gram (-). Pertenecen al grupo 2b de la clasificación de Bush y actúan sobre Penicilinas y Cefalosporinas de primera generación (TEM-1, TEM-2 y SHV-1).
- $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) derivadas por mutación de las BLEA, actúan sobre Penicilinas, Cefalosporinas de 1º, 2º, 3º y 4º G o monobactams (Aztreonam). No son afectadas las cefamicinas (Cefoxitina, Cefotetan) y carbapenems (Imipenem y Meropenem).

b) *Su localización*:

- Fuera de la pared celular [Cocos G(+)].
- Espacio periplásmico [Bacilos G(-)].

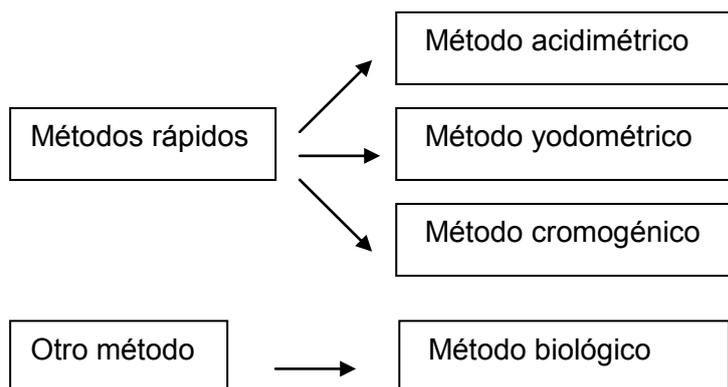
c) *La naturaleza de la enzima*:

- Constitutiva (siempre presente), usualmente mediada por plásmidos.
- Inducible (capaz de ser activada), usualmente de tipo cromosómica [Clase C del grupo 1 de la clasificación de Bush (AmpC)].



**Figura 13.1.** Hidrólisis de Penicilina y Cefalosporina por acción de la betalactamasa.

## Métodos para detección de la producción de $\beta$ -lactamasas



### Métodos rápidos

En ocasiones es necesario conocer incluso antes de las pruebas de sensibilidad si un microorganismo produce este tipo de enzima. Para ello se han desarrollado diferentes métodos rápidos de detección de  $\beta$ -lactamasas que, con una información preliminar, contribuyen a una correcta elección del antimicrobiano.

Estos tipos de pruebas son útiles en *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Saphylococcus aureus* e incluso en *Enterococcus* spp. (Tabla 13.1). En ellos es posible definir la resistencia a determinados  $\beta$ -lactámicos cuando el resultado es positivo. En otros microorganismos, *Enterobacteriaceae* o *Pseudomonas aeruginosa*, no deben emplearse ya que la posible producción simultánea de otras enzimas impide relacionar el resultado positivo con la resistencia a un determinado antibiótico o grupo de antibióticos.

**Tabla 13.1.** Utilidad de las pruebas rápidas de detección de  $\beta$ -lactamasas y su significado (modificado de Leitch, 1992).

| Microorganismo               | Método       |             |             | Resistencia a  |
|------------------------------|--------------|-------------|-------------|--|
|                              | Acidimétrico | Yodométrico | Cromogénico |  |
| <i>Staphylococcus</i> spp.   | X            | X           | X           | Penicilina<br>Ampicilina<br>Amoxicilina<br>Piperacilina<br>Ticarcilina |
| <i>Enterococcus faecalis</i> |              |             | X           |  |
| <i>Haemophilus</i> spp.      | X            |             | X           |  |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | X            | X           | X           |  |
| <i>Moraxella catharralis</i> |              |             | X           |  |
| <i>Bacteroides</i> spp.      |              |             | X           |  |

La mayoría de los métodos rápidos se basan en la detección del producto resultante de la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico por la enzima.

#### a). Método acidimétrico

Este método detecta la presencia de ácido peniciloico después de la hidrólisis de la penicilina, mediante un indicador de pH.

La detección del producto formado puede realizarse de las siguientes maneras:

*Empleando discos o tiras de papel.* Son sistemas acidimétricos comerciales que utilizan discos o tiras de papel impregnados con una solución alcalina (1,25 mmol/litro de NaOH) de Penicilina G (125  $\mu$ g/ml) y 0,1% de azul de bromocresol. Antes de utilizarse deben rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada, pudiendo para ello colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de Petri. La aparición de un color amarillo antes de los 5 minutos después de colocar 2-3 colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos o tiras rehidratadas indicará la presencia de  $\beta$ -lactamasas. No deben utilizarse cultivos líquidos.

*Empleando un medio líquido.* En este caso se emplean tubos estériles o placa de microtitulación con 0,1 ml de solución de Penicilina G (1 millón de U/ml) a pH 8,5 y rojo de fenol (0,5%). Esta solución puede prepararse añadiendo 2 ml de rojo de fenol 5%, 16,6 ml de agua destilada y 1,2 g de Penicilina G (1 vial de 20 millones de U). El pH se ajustará con hidróxido de sodio 1N. Los tubos una vez preparados pueden conservarse a -20°C durante 6 meses.

El cambio de color violeta de esta solución al amarillo antes de los 15 minutos a temperatura ambiente después de hacer una suspensión con 4-5 colonias de un cultivo, indicará la producción de  $\beta$ -lactamasa. La ausencia de cambio de color durante estos 15 minutos se considerará como negativo. Los cambios a partir de los 15 minutos pueden ser inespecíficos o producidos por el propio deterioro del reactivo. No obstante, algunas cepas de estafilococo, generalmente sin inducción previa pueden requerir más de 15 minutos para demostrar su capacidad de producción de  $\beta$ -lactamasa.

No debe añadirse cultivos líquidos sobre la solución de Penicilina puesto que puede modificarse el pH y variar el resultado de la prueba.

#### *Consideraciones*

- Este método no es muy utilizado en la práctica debido a que no tiene un punto final bien definido y es crítico el ajuste inicial de pH a 8,5.

#### **b). Método yodométrico**

Este método utiliza como sustrato principalmente Penicilina, aunque también se ha descrito con Cefalosporinas. En presencia de  $\beta$ -lactamasa se produce ácido peniciloico o cefalosporinoico, de acuerdo al sustrato utilizado, estos al disminuir el pH del medio provocan la reducción del yodo de una mezcla yodo-almidón del sistema desapareciendo el intenso color azulado que tiene este complejo. En ausencia de  $\beta$ -lactamasa no se decolora la mezcla yodo-almidón.

Este ensayo fue presentado inicialmente por Perret en 1954, sufriendo luego numerosas modificaciones de las cuales adoptamos las siguientes para utilizarla en el laboratorio para la detección de  $\beta$ -lactamasas.

#### *Ensayo micro-yodométrico de Novick modificado por Thornsberry.*

- En una placa de microtitulación o en un tubo de vidrio colocar 0,1 ml de la solución sustrato (Penicilina G -0,01 a 0,05 g- disuelta en 100 ml de buffer 0,1 M a pH 7 logrando una concentración final de 0,1 a 0,5 mg/ml).
- Resuspender en la solución de Penicilina 4-5 colonias de un cultivo puro de 18 a 24 horas de la cepa en estudio. Agitar 30 seg. y dejar la suspensión aproximadamente 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así que se lleve a cabo la reacción.
- Agregar 2 gotas de solución de almidón al 1%. Mezclar.
- Agregar 1 gota de reactivo de yodo. La mezcla se agita durante 1 minuto.

La suspensión se vuelve azul debido a la formación inmediata del complejo yodo-almidón, pero en presencia de  $\beta$ -lactamasas se produce una rápida decoloración. Si permanece azul por más de 10 minutos, la reacción se considera negativa.

*Adaptación en gel de Labia y Barthelemy.* La reacción se realiza en una placa de Petri que contiene, en gel-agar-sustrato, el clásico sistema yodo-almidón y el antibiótico, que inicialmente da un color azul. Sobre este se realizan perforaciones donde se coloca el inóculo bacteriano.

Al ser hidrolizado el antibiótico  $\beta$ -lactámico el gel es localmente decolorado, dando un halo incoloro alrededor del pocillo.

#### *Consideraciones*

- Se debe trabajar siempre con testigos positivos y negativos.
- Cuando se trabaja con cepas de estafilococos, tener en cuenta la característica inducible de la enzima, por lo tanto debe incubarse previamente la suspensión del germen en 4 ml de caldo con un disco de Oxacilina durante aproximadamente 2 horas para favorecer la inducción de la  $\beta$ -lactamasa. Luego realizar la reacción.
- No deben utilizarse cultivos en caldo ni muestras clínicas porque pueden tener reductores inespecíficos del yodo que podrían dar falsos positivos.

### Conclusiones

- Es menos específico que los otros métodos.
- Reactivos de bajo costo y disponibles en el mercado.
- Técnica de fácil realización.
- Punto final neto.
- Resultados en el día.

### c). Método Cromogénico

A diferencia del método acidimétrico y el yodométrico, el método cromogénico es altamente específico, aunque está limitado por la capacidad de hidrólisis que ejerza la  $\beta$ -lactamasa sobre la Cefalosporina cromogénica que se emplee. La más utilizada es el nitrocefín ya que en pocos segundos se puede obtener un resultado positivo. El nitrocefín es una Cefalosporina cromogénica descrita por O'Callaghan cuyo color amarillo es atribuido al sustituyente dinitrilo en la posición 3 de su molécula. Al ser hidrolizada por la  $\beta$ -lactamasa cambia su color al rojo intenso debido a la formación de una base de Shift cromogénica.

Esta técnica utiliza como reactivo Buffer fosfato pH 7 y nitrocefín, el cual se puede presentar en polvo, solución o disco. Cualquiera sea la presentación, la reacción se realiza poniendo en contacto una suspensión del germen con la Cefalosporina cromogénica. A los 30 minutos la aparición de un color rojo indica una reacción positiva. La permanencia de un color amarillo indica una reacción negativa.

El método del nitrocefín es el sistema más empleado para detectar la producción de  $\beta$ -lactamasas. Se han desarrollado diversas modificaciones, por ejemplo, dispensar directamente sobre las colonias de un cultivo unas gotas de solución de nitrocefín o colocar sobre la superficie de una placa de crecimiento un papel impregnado de nitrocefín. Se emplea para poder detectar subpoblaciones que no produzcan  $\beta$ -lactamasa.

### Consideraciones

- Puede usarse otra Cefalosporina cromogénica PADAC (Piridin-2-azo-p-dimetil-alinina cromóforo). Pero es peor sustrato y por lo tanto menos sensible.
- Es el método de elección para la detección de  $\beta$ -lactamasas de *Haemophilus influenzae* tipo B. Se debe utilizar un inóculo denso y realizar la lectura a los 30 minutos debido a la posible presencia de la enzima tipo ROB-1.

### Conclusiones

- Tiene mayor sensibilidad.
- Es un método simple rápido y el reactivo utilizado es estable.
- Útil para detectar  $\beta$ -lactamasas en *Enterococcus* spp.

### Limitaciones de los métodos rápidos de detección de la producción de $\beta$ -lactamasas

En general, estas pruebas solo indican la producción de la enzima, no son cuantitativas y no sirven para saber el tipo de enzimas que se produce. Asimismo, la mayoría de los métodos emplean Penicilina por lo que no es muy sensible cuando el microorganismo a estudiar produce una  $\beta$ -lactamasa con baja afinidad o tasa de hidrólisis de este sustrato.

Por otra parte, el resultado positivo indica que la cepa es resistente al antibiótico, para el cual es útil la prueba pero no excluye, en caso de ser negativo, que pueda existir otro mecanismo de resistencia y por lo tanto que pueda emplearse o no dicho antibiótico.

### Otro método para detectar $\beta$ -lactamasas

#### Método Biológico

Este método se basa en hallar la presencia de  $\beta$ -lactamasas por detección microbiológica de la baja actividad antibacteriana del producto formado.

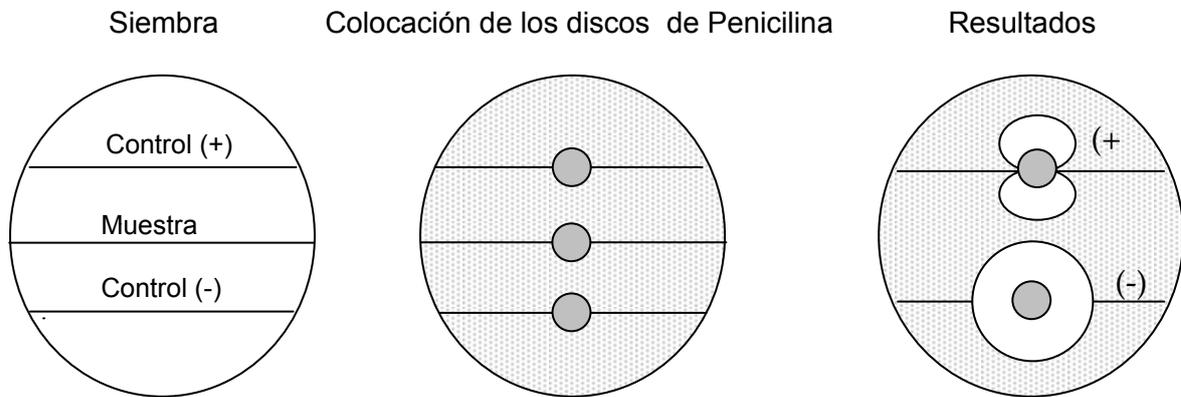
Es de extrema sensibilidad, permite utilizar distintos sustratos según el disco que se elija pero el inconveniente de esta técnica es el tiempo requerido para la obtención de los resultados.

Se utiliza agar Mueller Hinton fundido y enfriado al cual se le agrega una suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* sensible a la Penicilina, distribuidos en placas.

En la placa se siembran en líneas suspensiones de bacterias productoras (control positivo: *Enterobacter cloacae* ATCC 202) y no productoras (control negativo: *S. aureus* ATCC 25923) de  $\beta$ -lactamasas y la muestra incógnita.

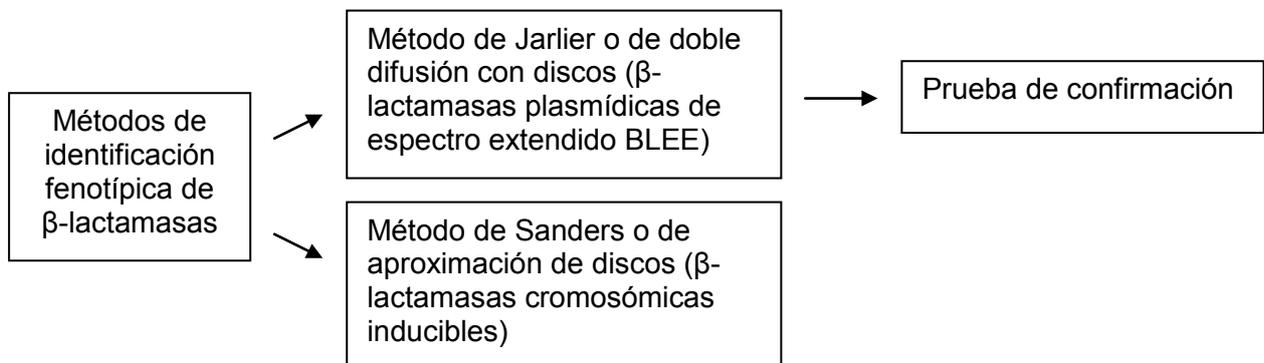
Sobre estas líneas de siembra se colocan discos de Penicilina o tiras de papel impregnadas con la misma. Estas placas se incuban a 37°C pudiendo leerse a partir de las 24 horas.

La producción de  $\beta$ -lactamasas se evidencia por la deformación del halo de inhibición que da la Penicilina sobre el desarrollo de *Bacillus subtilis*, en la zona donde se cruza dicho halo con la estría de la cepa productora de  $\beta$ -lactamasa (Figura 13.2).



**Figura 13.2.** Esquema de siembra y resultados del método biológico de detección de  $\beta$ -lactamasas.

### Métodos para la identificación fenotípica de $\beta$ -lactamasas en bacilos Gram-negativos

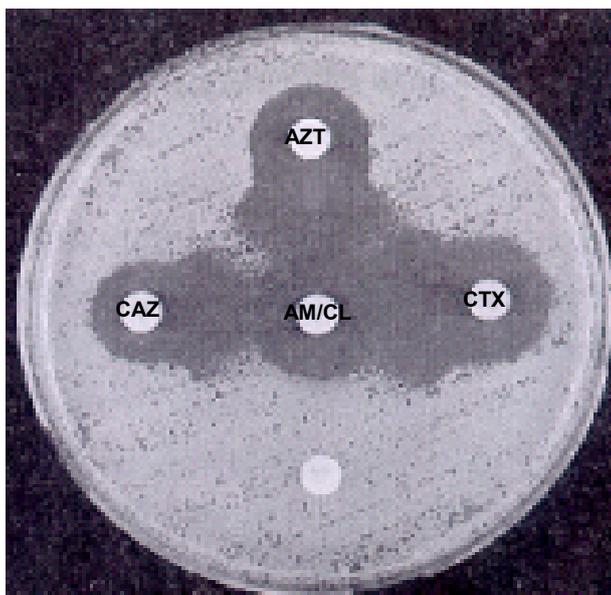


El antibiograma por difusión con discos puede ser utilizado como una herramienta útil y sencilla para la identificación fenotípica y detección de  $\beta$ -lactamasas en algunos microorganismos.

Ejemplos son la  $\beta$ -lactamasas plasmídica de espectro extendido BLEE (prueba de doble difusión) y las cromosómicas inducibles de clase 1 AmpC (prueba de aproximación de discos).

#### 1). Prueba de doble difusión (Jarlier)

Este método se basa en la excelente actividad del Ácido Clavulánico para inhibir a la mayoría de las BLEE (superior a Sulbactama o Tazobactama). Consiste en la realización de un antibiograma convencional situando un disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AM/CL) a una distancia aproximada de 20 mm de discos de Cefotaxima (CTX), Ceftacídima (CAZ) y Aztreonan (AZT). La ampliación del halo de inhibición "forma de huevo" de estos últimos en las proximidades del disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico indica que estamos frente a una cepa **sospechosa** de producir BLEE (Figura 13.3).



**Figura 13.3.** Prueba de doble difusión con discos. Ampliación de los halos de inhibición de la Cefotaxima, Ceftacidima y el Aztreonam debido a la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa plasmídica de espectro extendido por la acción del Ácido Clavulánico contenido en el disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (en el centro de la placa).

Este método está recomendado por la NCCLS para cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* que presentaron halos de inhibición reducidos, al realizar un antibiograma por el método de difusión con discos para los siguientes antibióticos:

Cefpodoxima CPD  $\leq 17$  mm

Ceftacidima CAZ  $\leq 22$  mm

Cefotaxima CTX  $\leq 27$  mm

Ceftriaxona CRO  $\leq 25$  mm

Aztreonam AZT  $\leq 27$  mm

Para otras enterobacterias, SADEBAC (Sociedad Argentina de Bacteriología) propone considerar como sospechosas de BLEE a aquellas cepas que presenten halos de inhibición a CTX  $\leq 26$  mm.

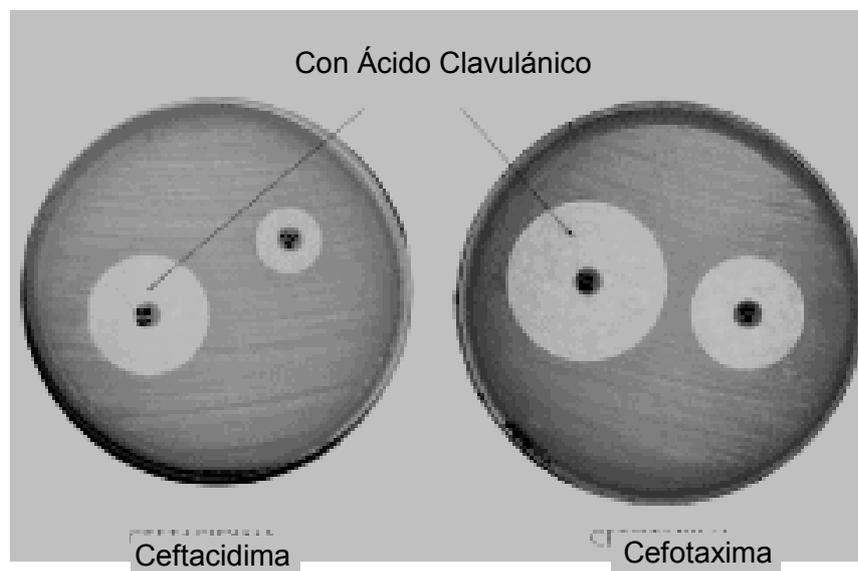
#### Confirmación de la producción de BLEE

Para confirmar la presencia de BLEE se deben enfrentar discos de:

Cefotaxima 30  $\mu$ g y Cefotaxima 30  $\mu$ g + Ác. Clavulánico 10  $\mu$ g

Ceftacidima 30  $\mu$ g y Ceftacidima 30  $\mu$ g + Ác. Clavulánico 10  $\mu$ g.

Si se observa un incremento  $\geq 5$  mm en el halo del disco de antimicrobiano ensayado en combinación con el Ác. Clavulánico versus el diámetro del halo del disco de antimicrobiano solo se **confirma** la producción de BLEE (Figura 13.4).

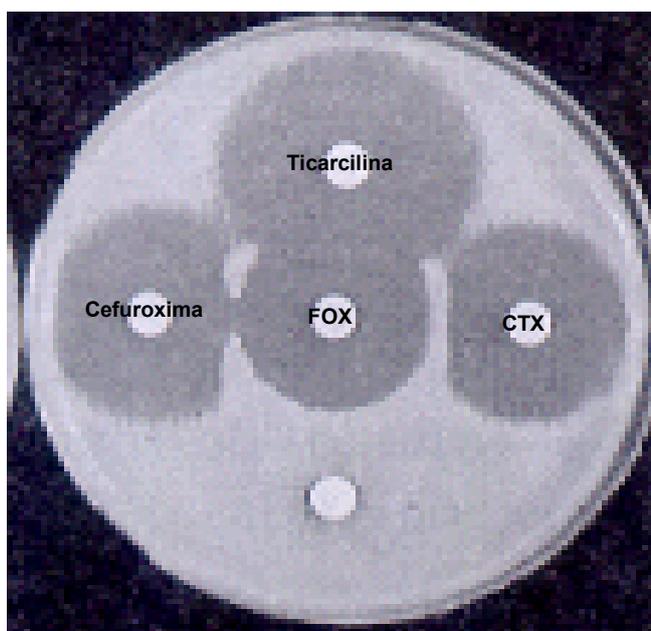


**Figura 13.4.** Confirmación de la producción de BLEE. Se observa un aumento  $\geq 5$  mm en los halos de los discos en los que se combinaron el antimicrobiano + Ácido Clavulánico en comparación con los halos de los discos de los antimicrobianos solos.

## 2). Prueba de aproximación de discos (Sanders)

Algunas bacterias producen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de carácter inducible. Estas enzimas habitualmente se expresan a niveles muy bajos, pero pueden incrementar su síntesis en presencia de determinados antibióticos  $\beta$ -lactámicos, llamados inductores (tabla 13.2), produciéndose el fenómeno de inducción.

La metodología para detectarla consiste en realizar un antibiograma convencional colocando un disco de Cefoxitina (FOX) u otro antibiótico inductor a 20 mm de un disco de Cefuroxima o Cefotaxima (CTX) (antibiótico testigo). El microorganismo produce  $\beta$ -lactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antibiótico testigo en la zona adyacente al disco del antibiótico inductor (Figura 13.5).



**Figura 13.5.** Prueba de aproximación de discos. Efecto inductor de Cefoxitina (FOX) (en el centro de la placa), objetivado por el achatamiento de los halos de inhibición de la Ticarcilina, Cefotaxima (CTX) y Cefuroxima, en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* productor de  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC en su estado inducible.

**Tabla 13. 2.** Antibióticos inductores de la síntesis de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles.

| Antibiótico                              | $\beta$ -lactamasa       |                             |                      |                            |                               |                         |
|--|--------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|  | Grupo 1 (AmpC)           |                             |                      |                            |                               | Grupo 2be               |
|  | <i>Enterobacter</i> spp. | <i>Citrobacter freundii</i> | <i>Serratia</i> spp. | <i>Morganella morganii</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| Aminopenicilinas                         | +++                      | ++                          | +++                  | +++                        | +++                           | +++                     |
| Ácido Clavulánico                        | +++                      | +++                         | +++                  | +++                        | +++                           | -                       |
| Ureidopenicilinas                        | +                        | +                           | +                    | +                          | +                             | +                       |
| Carboxipenicilinas                       | +                        | +                           | +                    | +                          | +                             | +                       |
| Cef 1 <sup>a</sup> / 2 <sup>a</sup> gen. | +++                      | +++                         | +++                  | +++                        | +++                           | +++                     |
| Cef 3 <sup>a</sup> gen.                  | +                        | +                           | +                    | +                          | +                             | +                       |
| Cefoxitina                               | +++                      | +++                         | +++                  | +++                        | +++                           | +++                     |
| Carbapenems                              | +++                      | +++                         | +++                  | +++                        | +++                           | +++                     |

Efecto inductor: elevado (+++); moderado (++); débil (+); nulo (-).

## Desarrollo Práctico N° 13

### Consignas

1. Determinación de la producción de  $\beta$ -lactamasas utilizando el método biológico.
2. Determinación de la producción de BLEE utilizando el método de Jarlier.
3. Confirmación de la producción de BLEE.
4. Determinación de la producción de BLEE inducibles utilizando el método de Sanders.

### Materiales necesarios

- Placas de Petri y tubos estériles.
- Medio de cultivo Mueller Hinton.
- Microorganismos: *Bacillus subtilis*, controles negativos: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y positivos: *Enterobacter cloacae* ATCC 202, *S. aureus* ATCC 29213 o *Klebsiella pneumoniae*, otras como *Pseudomonas* spp. y cepas en estudio.
- Discos de antimicrobianos: Penicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Cefotaxima (CTX), Cefoxitina (FOX), Ceftacidima (CAZ), Cefotaxima + Ácido Clavulánico, Ceftacidima + Ácido Clavulánico.
- Mechero, ansas, pinzas e hisopos estériles.
- Solución fisiológica estéril.

### Actividades

#### Método biológico de detección de la enzima

1. Fundir el medio de cultivo. Dejar enfriar a 50°C. Agregar una suspensión densa de *Bacillus subtilis*. Homogeneizar bien.
2. Distribuir en placas de Petri estériles. Dejar solidificar.
3. Realizar las siembras de las cepas controles y la cepa en estudio con ansa ojal.
4. Colocar los discos de penicilina.
5. Incubar a 37°C por 24 horas.
6. Leer e interpretar los resultados.

#### Determinación de BLEE (presuntiva y confirmatoria) y BLEE inducible

1. Preparar las placas de Petri de la misma manera que para la realización de un antibiograma común y sembrar de la misma forma con las cepas provistas por la cátedra.
2. Colocar los discos de antibióticos correspondientes para el método de Jarlier o Sanders a 20 mm de distancia entre ellos o para la prueba de confirmación de la producción de BLEE de acuerdo a lo asignado por la cátedra.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.
4. Leer e interpretar los resultados.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VI Curso teórico: Antimicrobianos desde el laboratorio. División Antimicrobianos, Instituto Nacional de Microbiología C. Malbrán. Octubre 1990.
- Amer, L.; Bargardi, S.; Guida A.; Jorda, G. Guía de trabajos prácticos de la cátedra de microbiología de bioquímica. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. 2000.
- Lennette. Ballows. Hausler Trueant. Manual de Microbiología Clínica 4ta Edición. Ed. Méd. Panamericana. 1983.
- Métodos especiales para la detección de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2001.
- Iañez, Enrique. Curso de Microbiología General. Resistencia bacteriana a los antibióticos. 2008. [http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm)
- Curso básico y avanzado de antibióticos. Cátedra de Bacteriología. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. Diciembre de 2002.

# Trabajo Práctico N° 14

## MÉTODOS DE RECUESTO MICROBIANO I

### Objetivos

- Conocer diversos métodos de recuento para la enumeración de microorganismos contenidos en una muestra.
- Evaluar las aplicaciones prácticas del recuento de microorganismos.
- Realizar la medida del número de individuos por métodos indirectos.

### Introducción teórica

La enumeración o recuento bacteriano se realiza por diversos métodos que, si bien no son exactos, son lo suficientemente precisos cuando se fijan límites y parámetros, como por ejemplo temperatura, tiempo, pH, atmósfera, etc.

Su empleo está muy desarrollado en alimentos en general, leche, agua y muestras clínicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, Ejemplo: orina.

### Concepto

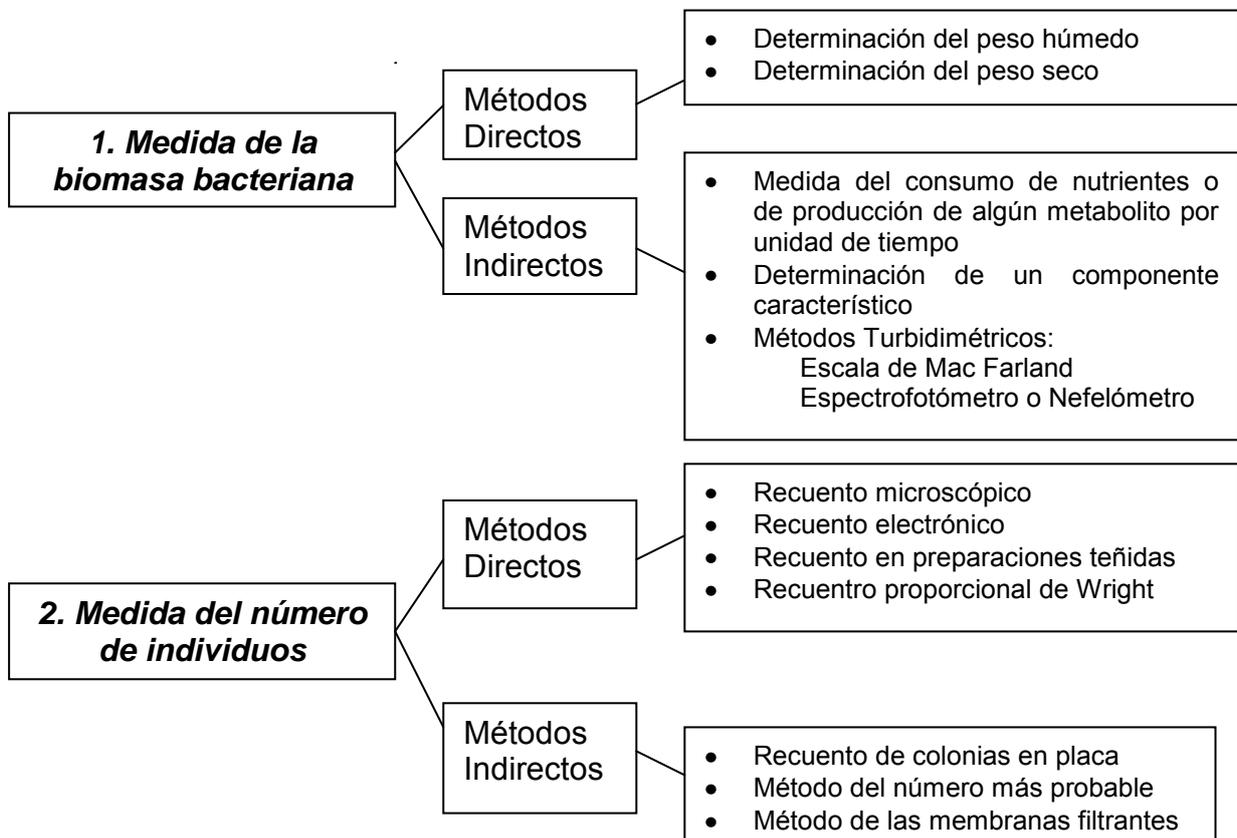
El desarrollo o crecimiento bacteriano consiste esencialmente en un activo proceso vital de asimilación y multiplicación de microorganismos. Por lo tanto, la determinación del número de bacterias por ml es importante para indicar la medida en que una bacteria crece y se desarrolla.

### Métodos de recuento microbiano

El crecimiento de una población bacteriana puede ser entendido desde diferentes perspectivas y de acuerdo a estas se puede llegar a determinar la medida del crecimiento mediante diversas metodologías.

Los métodos de determinación del crecimiento de una población o cultivo bacterianos se puede expresar en función de:

- aumento de biomasa del cultivo.
- aumento del número de células.



## 1. Medida de la biomasa bacteriana

### a. Métodos directos de medida de biomasa bacteriana

Para los fisiólogos bacterianos, bioquímicos y biólogos moleculares una medida del crecimiento es el incremento de biomasa. Para ellos, la síntesis macromolecular y un incremento en la capacidad para la síntesis de los componentes celulares es una medida del crecimiento. Para este grupo la división celular es un proceso esencial pero menor, que rara vez limita el crecimiento, ya que lo que limita el crecimiento es la capacidad del sistema enzimático para utilizar los recursos del medio y formar biomasa.

*Importante. Estos métodos requieren preparaciones limpias, sin partículas extrañas.*

*Determinación del peso húmedo.* Para esta determinación se tara un tubo de centrifuga. Se introduce el cultivo bacteriano o fúngico a cuantificar. Se centrifuga el cultivo, se elimina el sobrenadante y se determina el peso del sedimento.

*Inconvenientes:* grandes errores, debido al líquido intercelular retenido, cuya cuantía depende a su vez de la forma y tipo de agrupaciones de la cepa, intensidad del empaquetamiento, etc.

*Determinación del peso seco.* Como el anterior, pero el sedimento se seca antes de ser pesado (105 °C, toda la noche), hasta peso constante. Las medidas de peso seco suelen representar el 10-15% de los valores de peso húmedo.

*Inconvenientes:* método tedioso (requiere mucho tiempo) y con bastantes errores. Es difícil pesar menos de 1 mg con exactitud en las balanzas habituales de laboratorio. 1 mg de peso seco equivale a unas  $5 \times 10^9$  bacterias.

### b. Métodos indirectos de medida de biomasa bacteriana

*Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo.* Ejemplos: consumo de oxígeno ( $QO_2$ ) y consumo de carbónico ( $QCO_2$ ), determinados por el respirómetro de Warburg. Producción de ácidos.

*Determinación de un componente característico:*

Determinación del nitrógeno total. Existen distintas técnicas para determinar la cantidad de nitrógeno que contiene una muestra en relación al compuesto que se quiera determinar. Puede analizarse el nitrógeno no proteico mediante el  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ , el nitrógeno proteico mediante absorción en UV, Reacción de Biuret, Reacción de Lowry, o el nitrógeno total mediante la Digestión de Kjeldahl.

Determinación de ácidos nucleicos. Se determina la cantidad existente de un determinado ácido nucleico (generalmente DNA) y a partir de este dato se estima la masa de la población.

*Métodos turbidimétricos (ópticos).* La base común de estos métodos consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano.

Recordemos aquí que las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua. La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

Los métodos turbidimétricos requieren de una técnica o un dispositivo que permita la estimación del número de microorganismos en relación a la turbidez del cultivo. Esto puede realizarse manualmente, a ojo desnudo empleando una escala de turbidez calibrada conocida como "escala de Mac Farland" o bien empleando dispositivos de lectura como el Turbidímetro, Espectrofotómetro o Nefelómetro.

Escala de Mac Farland. Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen 1% de  $Cl_2Ba$  + cantidades crecientes de  $SO_4H_2$  al 1%. En cada tubo, designado con un número, se origina un precipitado de  $SO_4Ba$  responsable de la turbidez, al que se le asigna el valor de concentración bacteriana. Por ejemplo, el tubo al 0,5 de Mac Farland se corresponde con una turbidez

equivalente a  $1 \times 10^8$  bacterias/ml. La escala comienza en 0.5 y llega hasta 6 o más. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (en céls/ml) que genera una turbidez similar.

*Inconveniente:* es un método poco preciso, que solo se emplea cuando no hace falta exactitud. Ha sido desplazado, en algunos casos, por los métodos espectrofotométricos.

*Ventajas:* método económico y muy práctico para ser empleado en la práctica clínica cotidiana, sin necesidad de contar con un aparato de medición. Se emplea en la técnica de Kirby Bauer para la determinación de sensibilidad bacteriana a antimicrobianos.

Espectrofotómetro. Este aparato es de uso habitual en cualquier laboratorio de Microbiología o Bioquímica. Mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia.

$$D.O. = A = -\log T/100 \text{ donde } T = \text{transmitancia}$$

Se debe realizar una curva estándar para relacionar los valores de A con la masa bacteriana.

*Comentarios:* la cantidad de luz dispersada es proporcional al cociente entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda incidente; por lo tanto, la sensibilidad de la técnica aumenta a longitudes de onda cortas. La proporcionalidad entre A y masa bacteriana solo es válida para  $>10^7$  céls/ml.

Nefelómetro. Es un aparato similar al anterior, pero el dispositivo sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente, y lo que se mide es la luz dispersada directamente por la preparación.

*Ventajas:* posee mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.

*Desventajas:* no es un aparato de uso habitual en un laboratorio clínico

## 2. Medida del número de Individuos

### a. Métodos directos de medida del número de individuos

*Recuento microscópico.* Es una técnica común, rápida y barata que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuento. Las más utilizadas, para recuentos bacterianos, son las de *Hawksley* y la de *Petroff-Hausser*. La primera tiene la ventaja que puede ser utilizada con objetivos de inmersión, aunque la mayoría de los recuentos se realizan con objetivos secos. Para recuento de esporas fúngicas o levaduras puede emplearse la cámara de *Neubauer* de uso habitual en clínica para recuento de células sanguíneas: leucocitos y eritrocitos.

*Ventajas:* una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados.

*Desventajas:* la mayor dificultad del recuento en cámara es obtener reproducibilidad en el llenado de la cámara con líquido. Otra dificultad es la adsorción de las células en las superficies del vidrio, incluyendo pipetas. Esta adsorción es crítica en el proceso de dilución de la muestra y se minimiza al realizar las diluciones en medios de alta fuerza iónica (solución fisiológica o medios mínimos sin fuente de carbono).

Cámara de Recuento de Neubauer: consiste en un portaobjetos especial que posee un rayado en su superficie con dos zonas bien definidas:

1°. Un reticulado central (similar al de la cámara de Petroff Hauser) para recuento de eritrocitos.

2° Un reticulado periférico que consta de 4 cuadrados divididos en 16 cuadraditos, donde se cuentan los leucocitos, esporas o levaduras.

Las características particulares de su empleo lo desarrollaremos en el siguiente práctico.

Cámara de recuento de Petroff-Hausser: consiste en un portaobjetos especial (Figura 14.1) con una graduación en superficie y unas medidas muy concretas.

- excavación con 0.02 mm de profundidad;
- área de  $1 \text{ mm}^2$ , dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes; cada cuadrado grande está subdividido a su vez en  $4 \times 4 = 16$  cuadrados pequeños. O sea, la muestra se distribuye en  $16 \times 25 = 400$  celdillas (cuadros pequeños).

La muestra, una vez dispensada entre el porta y el cubre, se deja reposar sobre la plataforma del microscopio durante unos minutos, y se cuenta el número de células en varias celdillas (normalmente en 16, equivalentes a uno de los cuadros grandes). Se anota el número **n** de células observadas en esas 16 celdillas.

Entonces, la concentración celular es fácil de establecer:

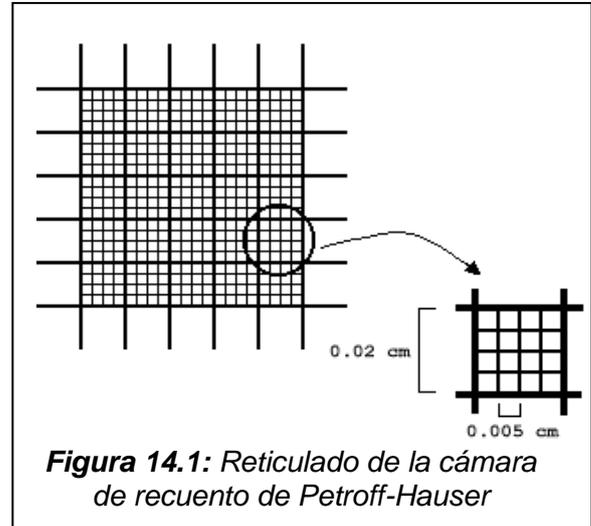
$$n \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células/ml.}$$

Donde:

- n células observadas en las 16 celdillas,
- 25 equivale al número de cuadrados del retículo,
- 50 equivale a la inversa de 0,02 (1/0,02=50) que es una corrección por profundidad y
- 1000 conversión de los mm<sup>2</sup> en ml.

*Ventajas:* es un método muy rápido.

*Inconvenientes:* solo sirve para suspensiones relativamente concentradas (>10 x 10<sup>6</sup> céls/ml). Por debajo de este valor el número de células vistas en el campo del microscopio es muy pequeño y poco significativo estadísticamente. En bacterias móviles, hay que inmovilizarlas previamente, con una mezcla de alcohol y agua.



**Figura 14.1:** Reticulado de la cámara de recuento de Petroff-Hauser

*Contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter).* Los contadores electrónicos permiten realizar recuentos de bacterias, levaduras no filamentosas y protozoarios, pero no de hongos y microorganismos filamentosos o miceliares.

Se hace pasar una suspensión bacteriana por un tubo capilar, entre los dos polos de una corriente eléctrica. Cada vez que por un orificio (30 μm diámetro) pasa una partícula (ejemplo, bacteria) se interrumpe la corriente, lo cual es recogido por un dispositivo de registro electrónico, que detecta el número y el tamaño de las partículas que van pasando (el tamaño detectado es función de la intensidad del pulso de voltaje al paso de la partícula). Recientemente se ha introducido la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Es una sofisticada modificación en la que las partículas a contar se marcan previamente con un anticuerpo monoclonal u otro ligando específico hacia alguna molécula de superficie, unidos a su vez a un fluorocromo, una molécula que emite fluorescencia al incidir sobre ella un haz de luz láser.

*Desventajas:* este tipo de recuento presenta algunos inconvenientes. Ciertas bacterias muy pequeñas producen cambios en la resistencia que son comparables al "ruido" generado por la turbulencia que se desarrolla al pasar el fluido por el orificio. No pueden medirse células que formen filamentos o agregados o soluciones muy concentradas de microorganismos, debido a que el pasaje de más de una célula en un breve período de tiempo va a ser tomado como una célula más grande. Es común la obstrucción del orificio por microorganismos muy grandes.

*Recuento en preparaciones teñidas.* Se dispone de un porta con una excavación circular (de área **At**) con un volumen conocido (**v**). Sobre esta excavación se extiende la muestra con asa de siembra o con micropipeta, y se fija y tiñe por algún colorante. Se observa con un microscopio dotado de un juego de ocular y objetivo que delimitan un área de campo (**Ac**). Si en dicho campo se cuentan **n** bacterias, la concentración de bacterias por mililitro será:

$$\text{Bacterias/ mililitro} = n \cdot At / Ac \cdot 1/v$$

*Recuento proporcional de Wright.* Se mezcla la suspensión bacteriana problema con una cantidad conocida de bolitas de látex o de hematíes. La concentración bacteriana se deduce de la proporción de bacterias y partículas observadas en el mismo campo microscópico. Este método se emplea más frecuentemente en Virología.

## b. Métodos indirectos de medida del Número de individuos

Son métodos que miden el número de bacterias viables (que no equivale al de totales).

*Método del número más probable.* Su fundamento estriba en la distribución de Poisson: una distribución aleatoria de partículas en una serie de muestras iguales, en función del número medio de partículas presentes en una suspensión.

$$P_x = m^x \cdot e^{-m}/x!$$

donde  $x$  = número real de partículas en cada muestra y  $m$  = concentración ( $n^\circ$  partículas/volumen).

La técnica consiste en la inoculación de series de tubos (generalmente 3, 4 o 5) que contienen un medio líquido apropiado y se siembran con tres volúmenes diferentes de muestra o con tres diluciones diferentes del material a examinar. Se incuban los tubos durante 24 a 48 horas y se registra el número de tubos con desarrollo microbiano en cada una de las series. Mediante el uso de tablas de Mc Crady elaboradas sobre estudios estadísticos se determina el número más probable de microorganismos en la muestra original. Para alimentos, en general se expresa en NMP/gr o NMP/ml de muestra, dependiendo del estado sólido o líquido del mismo. Para agua, se expresa como NMP/100 ml. Es el método de elección para evaluar coliformes fecales.

*Recuento de células viables en placa.* Es una de las técnicas de recuento más usadas en la rutina del laboratorio de Microbiología para determinar el número de células viables o de unidades formadoras de colonias en una muestra. Las principales etapas son:

- 1) Se mezclan y homogenizan porciones de muestras de alimento (o agua).
- 2) Se efectúan diluciones decimales de las mismas con un diluyente apropiado.
- 3) A partir de las diluciones, se efectúan siembras en superficie o en la masa de un medio agarizado.
- 4) Se incuba a temperatura apropiada durante un tiempo preestablecido.
- 5) Se cuentan las colonias.
- 6) Por medio de cálculos apropiados se expresan el número de colonias (UFC: unidades formadoras de colonias) por gramo de muestra.

En un laboratorio convencional normal, el método más sensible para descubrir la presencia de una bacteria viable consiste en permitir que aumente de tamaño por sí sola para formar una colonia visible. Esto constituye la base de los métodos de recuento en placas, que podemos clasificarlos en:

*Método de dilución en placa.* Una cantidad medida de la muestra (1 ml), o una dilución de la misma, se coloca en una caja de Petri esterilizada y se le añaden 15 ml de agar fundido y enfriado a 45 – 50°C. Después se incuba a 37°C por 18 - 48 horas y se realiza el recuento de colonias a simple vista, con una lupa o en un contador especial.

*Método por diseminación en superficie.* Una cantidad medida (0,1 a 0,001 ml) de la muestra o una dilución de la misma se deposita sobre la superficie del agar sólido y se disemina en toda su superficie, mediante el empleo de una espátula de Drigalski o un ansa. Así podemos decir que existen dos técnicas, según el instrumento empleado en la diseminación de la muestra:

a. *Técnica por estrías en medios de Agar:* ampliamente utilizado en el recuento microbiano de muestras de orina. Se sumerge en la muestra un ansa calibrada (0,02, 0,01, 0,001 ml), teniendo en cuenta de retirarla en forma vertical para que quede cargado el ojal del ansa. Se deposita la muestra en la superficie del agar diseminándola con el ansa.

b. *Técnica de diseminación con espátula de Drigalski.* Se utiliza ampliamente en el recuento de hongos y levaduras de muestras de alimentos. Se coloca 0,1 ml de la muestra o una dilución de la misma sobre el agar y se disemina mediante la espátula de Drigalski.

*Recuento sobre filtros de nitrocelulosa.* Se usa para suspensiones diluídas de bacterias. Se hace pasar un gran volumen de suspensión (puede ser líquido o aire) a través de una membrana de nitrocelulosa estéril, que retiene las bacterias. Posteriormente, el filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias se forman sobre el filtro y se cuentan, deduciéndose la concentración original en función del volumen de suspensión que se hizo pasar por el filtro.

## Desarrollo Práctico N° 14

En el presente práctico realizaremos el recuento de células viables, tomando la medida del número de individuos mediante la aplicación de métodos indirectos de recuento de colonias en placas

### Consignas

1. Acondicionamiento de la muestra: preparación de las diluciones decimales.
2. Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Totales (BAMT).
3. Recuento de Hongos y Levaduras (HyL).
4. Recuento de coliformes (Método del número más probable, NMP).

Cada grupo de trabajo deberá procesar la muestra asignada por el tutor. Es conveniente seguir los pasos abajo indicados, en orden y prestando mucha atención al procedimiento.

### Materiales necesarios

- Muestras
- Mecheros
- Placas de Petri estériles
- tubos estériles
- Erlenmeyer con 90 ml de Agua peptonada
- Pipetas estériles
- Espátula de Drigalski
- Medios de cultivo: Agar para Recuento (PCA), caldo Mac Conkey, Agar Hongos y Levaduras (HyL).

### Actividades

#### Acondicionamiento de los medios y materiales para los recuentos

1. Colocar a fundir el medio HyL (en erlenmeyer) y PCA (en tubos).
2. Una vez fundidos se deberá:  
Distribuir el medio HyL en 6 placas de Petri estériles.  
Los tubos con PCA llevar a baño termostático (controlar que la temperatura se encuentre a 50 °C).
3. Rotular los tubos con Caldo Mac Conkey, las 6 placas con HyL y 6 placas de Petri estériles vacías (para PCA), colocando: N° de muestra, dilución que se va a sembrar, número de grupo y fecha.

#### Procedimiento de siembra

1. Preparación de la Suspensión madre y de las diluciones decimales.
2. Inoculación de las diluciones de la muestra asignada.
3. Llevar los tubos y las placas a las estufas de cultivo correspondientes en función de la temperatura de incubación necesaria: bacterias a 37°C y hongos a 25°C.

¡Cuidado con la colocación de las placas en las estufas!

- No apilar más de 6 placas.
- Los cultivos bacterianos se cultivan con la tapa hacia abajo.
- Los cultivos fúngicos se incuban con la tapa hacia arriba.

#### Preparación de las diluciones decimales

La preparación de diluciones a partir de una muestra tiene por objeto efectuar diluciones progresivas de dicha muestra, para poder realizar los recuentos microbianos posteriores. Para ello deberá escogerse el diluyente apropiado.

Diluyente. La característica principal de un buen diluyente es que no produzca modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la flora de las muestras que van a ser analizadas, es decir que mantenga lo más fielmente posible la flora de la muestra, sin suprimirla ni favorecer su desarrollo.

En muestras clínicas se emplea solución fisiológica (SF).

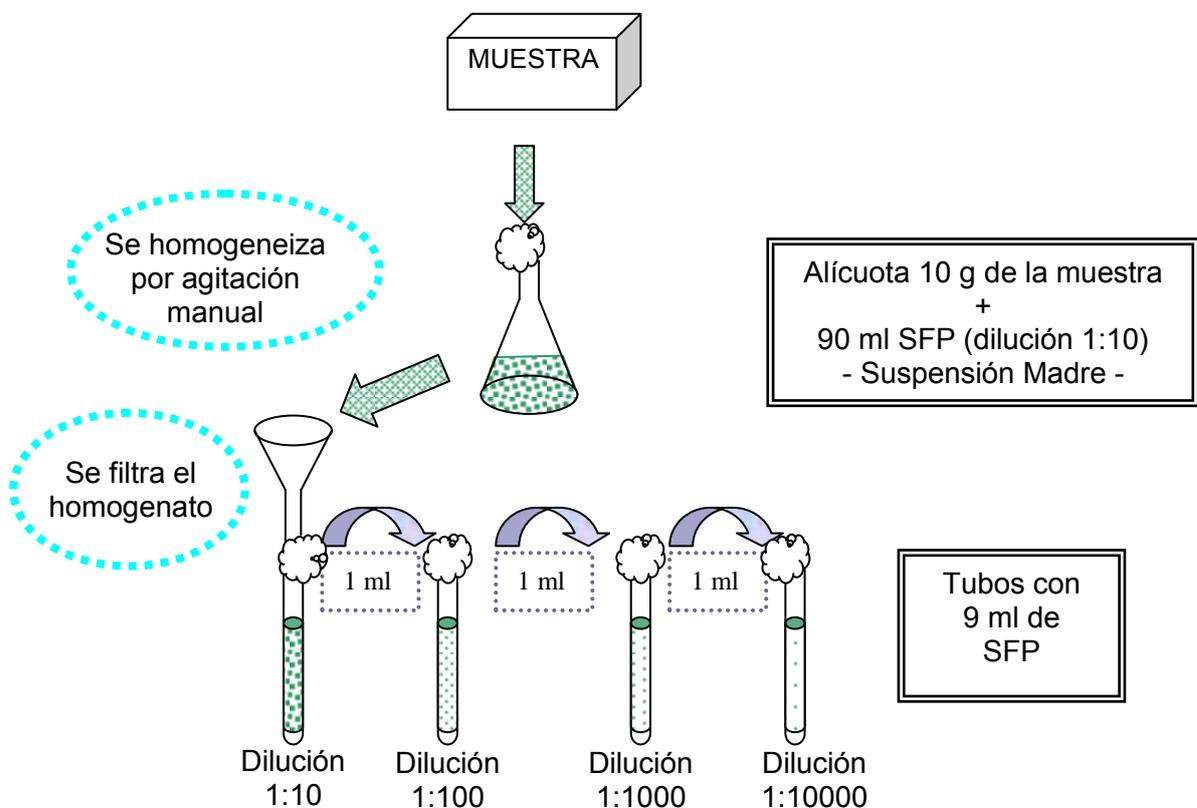
En muestras de alimentos se emplea Solución Fisiológica Peptonada (SFP = peptona 0,1%, y NaCl al 0,85%) o agua peptonada al 0,1%.

**Diluciones:** para realizar las diluciones decimales debe disponerse de un erlenmeyer con un volumen conocido de diluyente (ejemplo: 90 ml) y una serie de tubos conteniendo un volumen conocido de diluyente estéril (ejemplo: 9 ml). Se pesa asepticamente, una porción representativa de la muestra (ejemplo: 10 gr) y se colocan en 90 ml de diluyente.

Se obtiene así la Suspensión Madre (dilución 1/10), a partir de la cual se preparan las diluciones decimales, Figura 14.2.

- A 9 ml de diluyente estéril se le agrega 1 ml de la dilución 1:10, se homogeniza. Se obtiene así la dilución 1:100.
- A 9 ml de diluyente estéril se añade 1 ml de la dilución 1:100, se agita y se obtiene así la dilución 1:1000.
- Se debe operar así sucesivamente hasta obtener el número de diluciones requeridas.

El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la inoculación no debe ser mayor de 15 min.



**Figura 14.2.** Preparación de la suspensión madre y de las diluciones decimales.

### Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales – BAMT

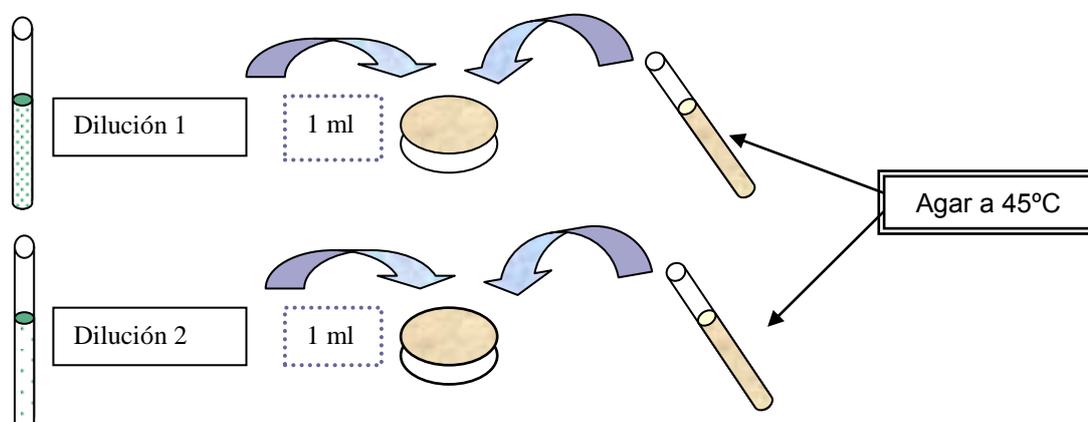
#### Método de Dilución en placas

Se preparan 2 placas de Petri para cada dilución. Se trabaja con tres a cuatro diluciones sucesivas para cubrir el rango de lectura, es decir, para obtener dos diluciones sucesivas que presenten un recuento de 10 a 300 colonias por placa.

#### Procedimiento

- **Agregado de la muestra.** Se trasvasa 1 ml de cada una de las diluciones preparadas a sendas placas de Petri esterilizadas, empleando la misma pipeta que se utilizó para mezclar la dilución respectiva.
- **Agregado del medio de cultivo PCA.** Se agregan de 12 a 15 ml de medio de cultivo, licuado y previamente enfriado a 45 °C, a cada placa de Petri inoculada, tan pronto como sea posible (Figura 14.3).

- *Mezclado del medio y del inóculo.* Se tapan las placas y se mezcla cuidadosamente el contenido de cada una de la forma siguiente:
  - a. Se imprimen a la placa 5 movimientos de vaivén en una dirección;
  - b. Se hace girar la placa 5 veces en el sentido de las agujas del reloj;
  - c. Se vuelven a imprimir 5 movimientos de vaivén en una dirección normal con la primera;
  - d. Se hace girar la placa 5 veces en el sentido contrario a las agujas del reloj.



**Figura 14.3.** Método de dilución en placas.

- *Solidificación del medio.* Se deja solidificar a temperatura ambiente sobre una superficie horizontal.
- *Incubación.* Se invierten las placas preparadas y se las coloca en la estufa regulada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se las debe acomodar de modo que estén alejadas de las paredes, techo y piso de la estufa, en grupos superpuestos de no más de 6 placas cada uno.
- *Temperatura y tiempo de incubación.* La temperatura y tiempo de incubación deben ser  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $48 \pm 2$  horas.
- *Recuento de colonias.* Se examinan las placas de Petri y se retienen aquellas que contengan entre 10 y 300 colonias. Se descartan las placas en que, por lo menos, la mitad de la superficie del agar esté invadida.

Para facilitar el recuento se pueden utilizar lupas o bien un contador automático. Se debe evitar contar, erróneamente, partículas de muestra insoluble o material precipitado.

- *Cálculo y expresión de resultados.* Se calcula el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de muestra mediante la fórmula siguiente:

$$N = \frac{\sum_n}{(f_a + f_b \times 0,1)d}$$

siendo:

- N el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra
- $\sum_n$  la suma de todas las colonias obtenidas en las placas contadas
- $f_a$  el número de placas leídas en la primera dilución (por ejemplo: 2 en placas duplicadas y 1 en una placa sola)
- $f_b$  el número de placas leídas en la segunda dilución
- d el factor de dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos (esta dilución corresponde a la denominada " $f_a$ " en la fórmula).

El resultado obtenido se redondea y expresa en UFC/g.

### Recuento de hongos y levaduras - HyL

- *Método de recuento por diseminación en superficie con espátula de Drigalski*

Se preparan 2 placas de Petri para cada dilución. Se trabaja con tres a cuatro diluciones sucesivas para cubrir el rango de lectura, es decir, para obtener dos diluciones sucesivas que presenten un recuento de 5 a 150 colonias por placa.

## Procedimiento

- *Inoculación del medio.* Se inoculan 0,1 ml de cada una de las diluciones preparadas a las placas de Petri, conteniendo medio de cultivo agar Hongos y Levaduras, con pipeta de 1 ml. Puede emplearse la misma pipeta, sembrando desde la dilución más alta hasta la mínima dilución.
- *Dispersión del inóculo.* Se disemina el inóculo en la placa empleando una espátula de Drigalski, realizando:
  - a. 20 movimientos concéntricos, girando la placa en el sentido de las agujas del reloj;
  - b. movimientos de vaivén que cubran toda la placa.

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

- *Incubación.* Se colocan las placas sin invertir en estufa de cultivo regulada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , y se las acomoda de modo que estén alejadas de las paredes, techo y piso de la estufa, en grupos superpuestos de no más de 6 placas cada uno. Se incuban durante 5 a 7 días.
- *Recuento de colonias de hongos y levaduras.* Después de la incubación, se cuentan las colonias y se diferencian las de levadura de las de hongos según su morfología. La identificación de colonias dudosas se debe realizar microscópicamente.
- *Cálculo y expresión de resultados.* Se examinan las placas que contengan entre 5 y 150 colonias. Si de una misma dilución se obtienen placas que contengan entre 5 y 150 colonias, se calcula el promedio. Si el número de colonias de alguna de las dos es mayor o igual que el doble de la restante, se consideran las otras diluciones para decidir cuál de las placas debe descartarse.

Se seleccionan las placas de dos diluciones consecutivas que contengan entre 5 y 150 colonias, se calcula el número promedio de levaduras y hongos, teniendo en cuenta la salvedad hecha anteriormente, según la fórmula,

$$N = \frac{\sum_c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d \times V_s} \text{ (UFC/g)}$$

siendo:

- $\sum_c$  la suma de las colonias contadas en las placas de Petri de diferentes diluciones
- N el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g)
- $n_1$  el número de placas de Petri con colonias entre 5 y 150 en la primera dilución
- $n_2$  el número de placas de Petri con colonias entre 5 y 150 en la segunda dilución
- d el factor de dilución correspondiente a la primera dilución
- $V_s$  el volumen de siembra expresado en mililitros (0,1 para el caso que nos ocupa).

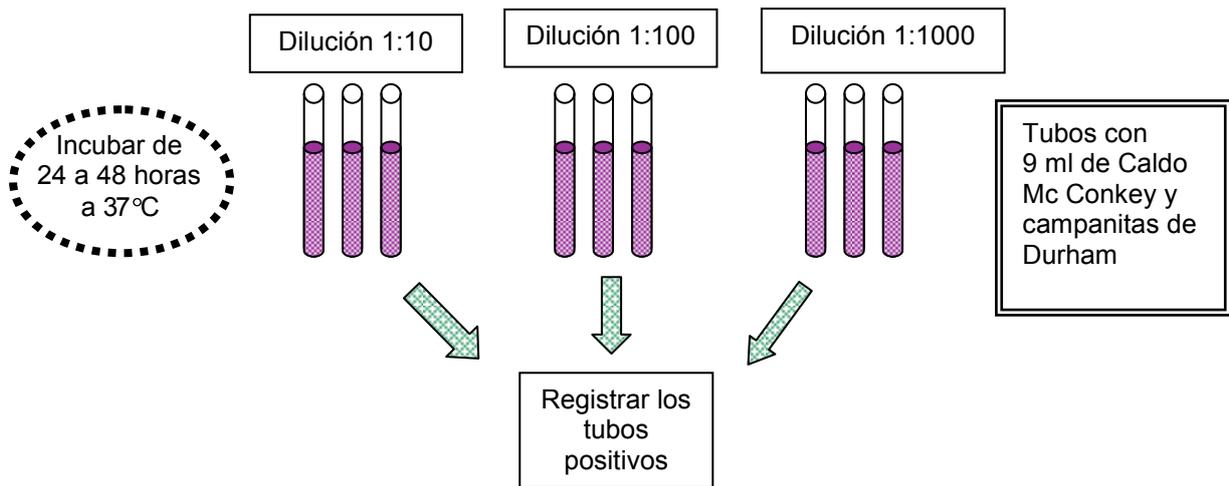
## Recuento de bacterias coliformes totales – NMP

*Método del Número más probable*

### Procedimiento

- *Inoculación.* Se transfiere 1 ml del inóculo de las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 a sendos tubos de ensayo que contengan caldo Mac Conkey, por triplicado para cada dilución, Figura 14.4. Se homogeniza suavemente cada tubo inoculado.
- *Incubación.* Se incuban los tubos en estufa de cultivo regulada a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $48 \pm 2$  horas.
- *Cálculo del NMP de bacterias coliformes totales.* Se examinan los tubos para verificar la formación de gas, que se evidencia por la aparición de burbujas en la campanita de Durham y acidez por viraje del color violeta del medio de cultivo al amarillo. Se anota el número de tubos positivos (gas y acidez) para cada dilución de la siguiente manera: Nro. tubos 1° dil: N° tubos 2° dil: N° tubos 3° dil.  
Ejemplo: si se obtuvieron los tres tubos positivos en la dilución 1:10, 2 tubos positivos en la dilución 1:100 y 1 tubo positivo en la dilución 1:1000, se anotaría **3:2:1**.  
Si se procesan más de tres diluciones, deben escogerse siempre tres diluciones consecutivas. Para ello se observa cual es la dilución en la que se obtienen los tres tubos negativos y se seleccionan las tres diluciones inmediatamente inferiores.

Ejemplo: si procesamos 5 diluciones,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , y obtenemos las siguientes lecturas **3:3:2:1:0**, en este caso escogeríamos las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dado que en la dilución  $10^{-5}$  se obtuvieron todos los tubos negativos. En nuestro ejemplo además, al resultado leído en las tablas del NMP debe multiplicarse por 10. Debido a que los resultados se tabularon para diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , toda vez que se procesan diluciones superiores deben multiplicarse por el factor correspondiente a la primera dilución, en el caso del ejemplo la primera dilución es  $10^{-2}$ , por eso el factor es 10. Si la primera dilución fuera  $10^{-3}$ , el factor sería 100, y así sucesivamente. Se ingresa a tablas confeccionadas para el método y se obtiene el NMP de bacterias coliformes/g. (Ver Tabla Anexo N° 3, tomada de la Norma IRAM 20517:2004).



**Figura 14.4.** Método del número más probable – serie de 3 tubos -

### Consideraciones para la Toma de muestra

La fracción de muestra destinada al análisis microbiológico deberá ser representativa de la totalidad de la muestra. Para ello existen programas de muestreo adecuados que deben conocerse a la hora de realizar un buen muestreo para determinar la carga microbiana en una muestra determinada, sea de origen biológico o industrial. Un buen muestreo permite obtener una muestra que sea representativa del material en estudio y esté libre de contaminantes.

Los conceptos de muestreo y programas de muestreo escapan a los fines del presente texto, de modo que no serán abordados aquí. Remitimos al lector interesado, la revisión de la bibliografía citada.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Joklik, W.K., y col. Zinsser Microbiología. Ed. Med. Panamericana. Ed.20. 1997.
- Adams y Moss. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). 1995.
- Díaz de Santos. María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria.1992.
- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Med. Panam., 7a Ed. 1989.
- Arquímedes Canese. Manual de Microbiología y Parasitología Médica. 5º Ed. 2000.
- Norma IRAM 20517:2007. Yerba mate canchada y yerba mate elaborada. Análisis microbiológico.
- Iáñez, Enrique. Crecimiento a nivel de Poblaciones microbianas.  
[http://fai.unne.edu.ar/microgeneral/14\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/microgeneral/14_micro.htm)

## Trabajo Práctico N° 15 MÉTODOS DE RECuento MICROBIANO II

### Objetivos

- Realizar la medida del número de individuos por métodos directos.
- Evaluar las aplicaciones prácticas del recuento de microorganismos por métodos directos.

En el desarrollo del presente trabajo práctico se realizará la medida del número de individuos mediante recuento microscópico directo empleando cámara de Neubauer.

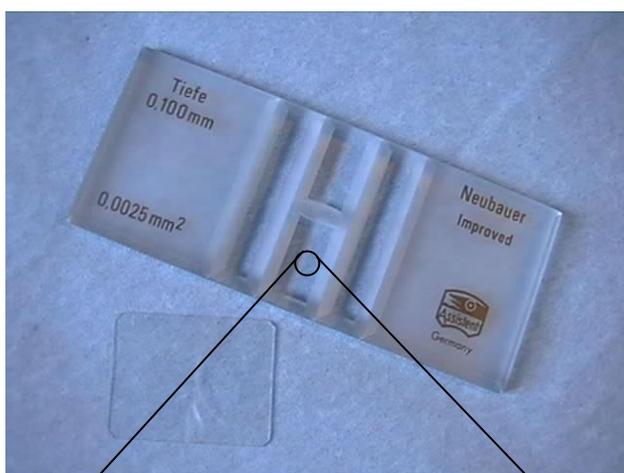
### Recuento en Cámara de Neubauer

Es un método directo de medida del número de individuos que se realiza con el empleo de una cámara de recuento con observación bajo un microscopio óptico.

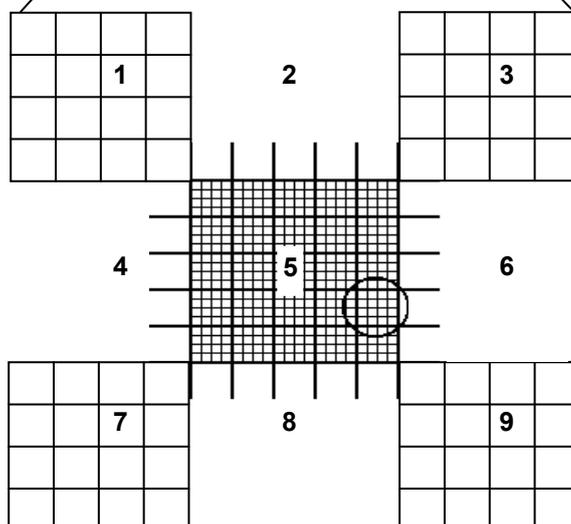
La cámara de Neubauer es un dispositivo de vidrio provista de dos zonas de reticulado en la misma cámara (Figura 15.1), de modo que pueden procesarse dos muestras simultáneamente. Entre las dos zonas y al costado de las mismas posee un surco para permitir el libre escurrido del exceso de líquido en el cargado de la cámara.

Cada zona de reticulado posee un rayado en su superficie con dos regiones bien definidas, Figura 15.2:

- 1° Un reticulado central para recuento de eritrocitos.
- 2° Un reticulado periférico que consta de 4 cuadrados divididos en 16 cuadraditos (1, 3, 7 y 9), donde se cuentan los leucocitos, esporas o levaduras.



**Figura 15.1.**  
Fotografía de una cámara de Neubauer (abajo el cubre objetos).



**Figura 15.2.**  
Rayado de la superficie de la cámara de Neubauer.

## Desarrollo Práctico N° 15

### Consignas

1. Recuento microscópico directo mediante empleo de cámara de Neubauer.
2. Ajustar el inoculo a una concentración indicada por el tutor.

### Materiales necesarios

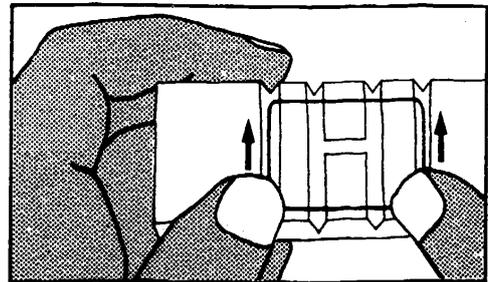
- Cámara de Neubauer.
- Tubos capilares.
- Microscopio.
- Suspensión de levaduras.

### Actividades

Se preparan las diluciones necesarias para poder contar las células, esporas o levaduras. Para recuento de leucocitos suele realizarse una dilución de 1/20 colocando en un tubo 0,38 ml de líquido de Turk y adicionando 0,02 ml (20  $\mu$ ) de sangre entera.

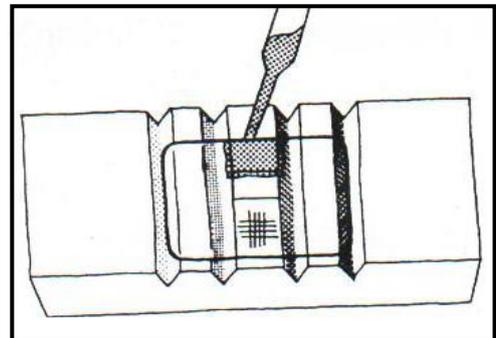
1. *Colocación del cubreobjetos:* se moja ligeramente los dos costados de la cámara y se presiona firmemente el cubreobjetos moviéndolo ligeramente hasta sentirlo firme.

*Nota:* cuando el cubreobjetos está bien adherido aparecen bandas coloreadas llamadas Anillos de Newton entre las dos superficies de los vidrios.



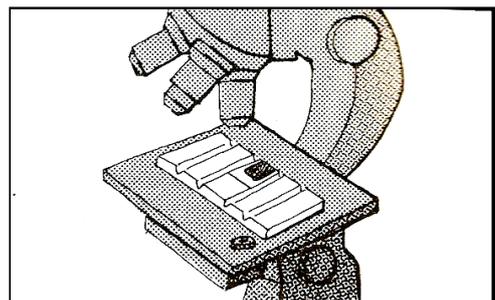
2. *Cargado de la cámara:* se emplea un capilar de vidrio o pipeta Pasteur de punta fina. Se lo acerca al borde del cubreobjetos para permitir que el líquido fluya libremente y se extienda uniformemente cubriendo todo el reticulado de un solo lado de la cámara. Inmediatamente debe ser retirado el capilar para evitar que la muestra se extienda al otro reticulado.

Importante: si el líquido fluye al surco entre los dos reticulados, se debe cargar nuevamente la cámara. Para ello remueva el cubreobjetos, limpie la cámara y el cubreobjetos con un chorro de agua de canilla y seque con papel absorbente. Proceda a la colocación del cubreobjetos y cargado de la cámara (Pasos 1 y 2).



3. Se deja en reposo la cámara por 3 minutos para permitir que las células sedimenten.

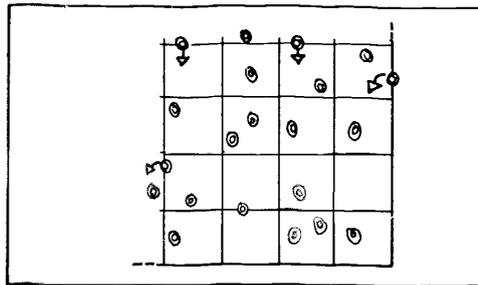
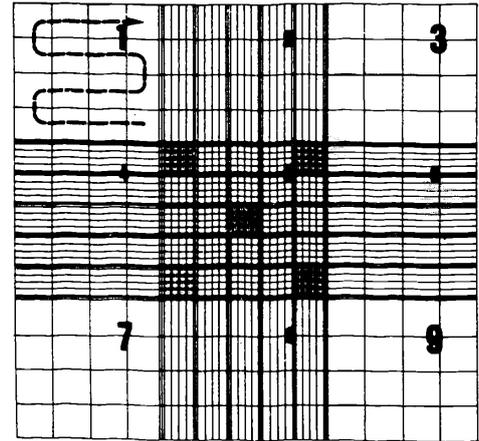
4. *Observación microscópica:* se coloca la cámara sobre la platina del microscopio y se ubica el reticulado de la cámara con un objetivo de 10X. Se reduce la cantidad de luz que entra al condensador ajustando el diafragma. Enfoque el reticulado de la cámara y proceda al recuento. Para una mejor visualización de las células puede ser necesario emplear el objetivo de 40X.



5. *Recuento en cámara:* teniendo en cuenta que la cámara de Neubauer posee:
- Área: 9 mm<sup>2</sup>
  - Profundidad: 0,1 mm

Se cuentan las células en un área de 4 mm<sup>2</sup> usando los cuadrados 1, 3, 7 y 9, siguiendo un recorrido que cubra todo el cuadrante, como se observa en la Figura.

Se incluye en el recuento las células observadas sobre las líneas de dos lados de cada cuadrado, como se observa en el siguiente recuadro que representa uno de los cuatro cuadrantes.



6. *Cálculos:* se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Células por mililitro: } \frac{N \times 10 \times d \times 1000}{4}$$

Donde:

- N suma de todas las células contadas en los cuatro cuadrantes  
 10/4 equivale al número de células por mm<sup>3</sup> (\*)  
 d inversa de la dilución empleada  
 1000 factor de conversión de los mm<sup>3</sup> en ml

(\*) Corrección por profundidad de cámara. Cada uno de los cuadrantes tiene un área de 1 mm<sup>2</sup>, el total del área contada es por lo tanto 4 mm<sup>2</sup>. La profundidad de la cámara es 0,1 mm, por lo tanto el volumen en que las células son contadas es 4 x 0,1 = 0,4 mm<sup>3</sup>. Así la división por 4 y multiplicación por 10 nos dará el número de células en un mm<sup>3</sup>.

7. *Ajuste del inóculo:* se emplea la siguiente fórmula: Vi x Ci = Vf x Cf

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Joklik, W.K., y col. Zinsser Microbiología. Ed. Med. Panamericana. Ed.20. 1997.
- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Med. Panam., 7a Ed. 1989.
- WHO. Manual of basic techniques for a health laboratory. World Health Organization. Geneva. 1980.

## Trabajo Práctico N° 16

### CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

#### Objetivos

- *Conocer metodologías que permitan evaluar la cinética del desarrollo microbiano en medio líquido.*
- *Aplicar técnicas espectrofotométricas de lectura para confeccionar una curva de crecimiento.*
- *Confeccionar una curva de crecimiento bacteriano empleando métodos de recuento microbiano.*
- *Comparar los resultados de ambos procedimientos y evaluar las ventajas y desventajas de cada uno.*

#### Fundamento

El crecimiento de un organismo es usualmente definido como un incremento ordenado de los componentes celulares. Con las bacterias, el resultado más obvio del crecimiento es el incremento en el número de células.

El método más común utilizado para determinar las fases de crecimiento de una población bacteriana es la medición de la turbidez de un cultivo en medio líquido, el cual puede ser detectado casi instantáneamente con un espectrofotómetro. Aunque dicha turbidez no es una medida directa del número de células, su incremento es una indicación del crecimiento bacteriano. Debido a que las células microbianas en una población son aproximadamente de tamaño constante, la cantidad de su dispersión de la luz será proporcional a la concentración de células presentes. Cuando la concentración de bacterias alcanza cerca de un millón de células ( $10^6$ ) por mililitro, el medio de cultivo comienza a verse turbio. Posteriores incrementos en la concentración celular resultan en un aumento en la turbidez y por lo tanto será transmitida menos luz a través del medio.

Para estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro, en el cual la luz pasa a través de un cultivo bacteriano hasta alcanzar una célula fotoeléctrica conectada a un galvanómetro. A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio, y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica, como consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células.

El cambio de luz se registra en el espectrofotómetro como porcentaje de transmisión (cantidad de luz transmitida) y absorbancia o densidad óptica (D.O.), valor derivado del porcentaje de transmisión, correspondiente al log del cociente entre la intensidad de la luz incidente sobre la suspensión ( $I_0$ ) y la luz transmitida por la suspensión ( $I$ ).

$$A = \log I_0/I$$

Este método tiene la desventaja de que incluye en su medición tanto organismos vivos como muertos.

Otro método para la determinación del crecimiento bacteriano es el recuento directo de células bacterianas en cámara de Petroff-Hausser.

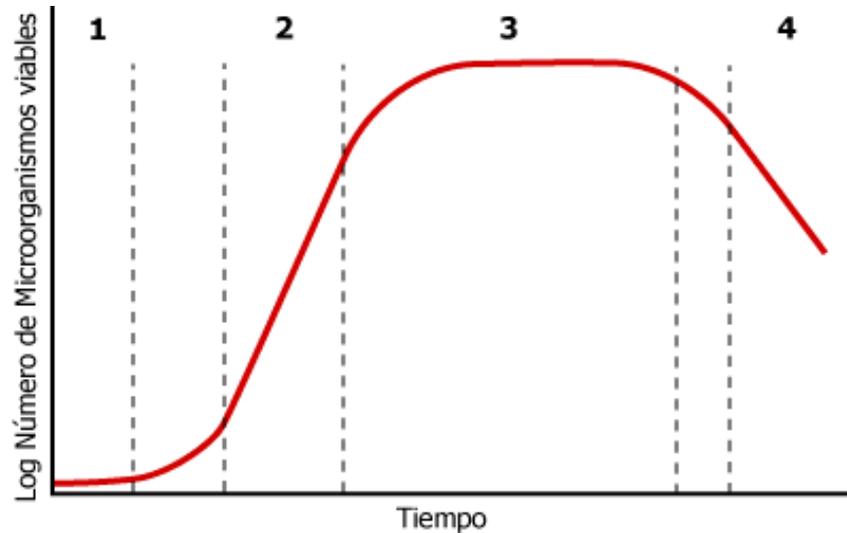
Los métodos mencionados tienen la desventaja de que incluyen en sus mediciones tanto organismos vivos como muertos. Para determinar el número de bacterias viables en un cultivo, se realizan diluciones del cultivo y se siembran volúmenes predeterminados en medios de cultivo apropiados, empleando los métodos de Diseminación en superficie y el método de Dilución en placas (siembra en profundidad). Cada microorganismo quedará aislado y seguirá creciendo en forma puntual hasta formar un grupo de bacterias detectables a simple vista.

Un cultivo bacteriano simple y homogéneo tiene un ciclo de crecimiento como el que se representa en la Figura 16.1.

Este ciclo tiene una morfología y una división de células asincrónica. Se divide en cuatro fases:

1. **Fase de Latencia.** Es la fase de adaptación al medio, existe aumento de la masa celular pero no hay aumento en el número de células.

2. **Fase de Crecimiento Exponencial.** Es la fase donde se produce un incremento exponencial del número de microorganismos.
3. **Fase Estacionaria.** Es la fase a la que se llega cuando se ha agotado la fuente de energía.
4. **Fase de Muerte.** Es la fase que se caracteriza por una disminución exponencial del número de microorganismos.



**Figura 16.1.** Curva de crecimiento microbiano: Microorganismos viables vs. Tiempo.

En general, cuando se inocula una pequeña población bacteriana en un medio de cultivo adecuado, el crecimiento no comienza inmediatamente, sino que hay un *periodo de latencia*. Un vez que empieza el crecimiento, se observa un incremento exponencial en la densidad celular, que corresponde a la *fase exponencial de crecimiento*. Esta fase es la más significativa en el ciclo de crecimiento de los microorganismos y se caracteriza porque los parámetros cinéticos del crecimiento se mantienen constantes. A medida que el crecimiento avanza, la concentración de los nutrientes esenciales disminuye, y se acumulan los productos finales del metabolismo, hasta que el crecimiento llega a detenerse, de modo que el cultivo entra en *fase estacionaria*. Después las células lentamente se mueren, lisándose en algunos casos, en una última *fase de muerte celular*.

## Desarrollo Práctico N° 16

El objetivo de este práctico es definir las fases de crecimiento en un cultivo de *Escherichia coli*, mediante la determinación de la absorbancia de la suspensión celular a diferentes tiempos de incubación.

### Consignas

1. Registrar las lecturas de densidad óptica (D.O.) en espectrofotómetro del caldo LB sembrado con *Escherichia coli*, cada 15 minutos.
2. Confeccionar una curva de crecimiento microbiano para *Escherichia coli* empleando papel milimetrado graficando D.O. vs. Tiempo.

### Materiales necesarios

- Erlenmeyer
- Pipetas estériles
- Ansas
- Espectrofotómetro
- Agitador orbital
- Microorganismo: *Escherichia coli*
- Medio de Cultivo:

#### Caldo LB:

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| Triptona.....             | 10 gr          |
| Extracto de levadura..... | 5 gr           |
| NaCl.....                 | 10 gr          |
| Agua destilada.....       | c.s.p. 1000 ml |

### Actividades

#### Medida del crecimiento en espectrofotómetro

1. Encender el aparato manteniendo 5 minutos de precalentamiento antes de realizar la lectura.
2. Fijar la longitud de onda,  $\lambda = 600$  nm, para absorbancia máxima de *E. coli*.
3. Ajustar el 0% de transmitancia empleando la cubeta negra correspondiente.
4. Colocar el control con el medio de cultivo sin inocular en el lugar de las muestras y ajustar el aparato a 100% de transmitancia.
5. Para medir la D.O. de las muestras, tomar 1 o 2 ml de cultivo bien homogeneizado en un tubo, situarlo en el lugar de las muestras y anotar la absorbancia (D.O.).

#### Confección de la Curva de crecimiento bacteriano

**1° día:** preparar el preinóculo. Sembrar un tubo conteniendo 10 ml de caldo LB con *E. coli* y cultivar a 37°C en agitador orbital manteniendo, una agitación de 180 rpm durante 15-20 horas.

**2° día:** a partir del cultivo del día anterior, se siembra con pipeta estéril un volumen determinado en un erlenmeyer con 100 ml de caldo LB y se mide la D.O. en espectrofotómetro. Esta medida corresponde al tiempo 0. Situar el matrás en el incubador orbital a 37°C y 180 rpm. La D.O. debe medirse cada 15 minutos, teniendo cuidado de agitar el matrás antes de tomar la muestra para realizar las medidas. Registrar el tiempo y las lecturas de absorbancia correspondientes y luego confeccionar una gráfica de la curva de crecimiento bacteriano.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7° Ed. Editorial Panamericana. Ed. 1983.
- Porco Giambra, Antonella. Elaboración de curvas de crecimiento bacteriano. En: "La evaluación microbiológica por reto microbiano en el desarrollo de productos con procesamiento mínimo". Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). Pág. 16-20. 1996.
- Bennasar, A. y col. 2° de Biología. Prácticas de microbiología 2007-2008. Capítulo VI. Estudio del crecimiento bacteriano. Pág. 31-36.
- Curva de crecimiento bacteriano [www.microbiología.com.ar](http://www.microbiología.com.ar)

## Trabajo Práctico N° 17

### CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL

#### Objetivos

- Conocer métodos de monitoreo microbiológico para ambientes controlados.
- Observar y caracterizar, mediante observación macroscópica y microscópica, la diversidad microbiana de un ambiente elegido por el alumno.

#### Introducción

El estudio de los ambientes controlados se inició con la industria electrónica y aeroespacial, así como en la industria farmacéutica para preparados estériles. Se necesita disponer de ambientes controlados para procedimientos asépticos, que no deben permitir una contaminación aérea microbiana más allá de ciertos límites bajos a fin de preservar la esterilidad del material con el cual se está trabajando.

El control microbiológico es necesario para la evaluación de la calidad microbiológica de zonas estériles en la industria farmacéutica, en gabinetes de seguridad y en estudios de la microbiota en ambientes naturales.

La contaminación aérea será directamente proporcional no solo a la concentración de microorganismos en el aire sino a la probabilidad de que estos accedan al elemento que no se debe contaminar, por ejemplo, boca de un frasco.

#### Definiciones

*Área limpia.* Es una sala donde se controlan los microorganismos presentes y se halla construida para minimizar la generación, introducción y retención de partículas en su interior; se controlan los parámetros fisicoquímicos y biológicos.

*Zona limpia.* Es un espacio donde se controlan las partículas aéreas (viables y no viables) y se halla construido para minimizar las mismas. Ejemplo: cabinas de bioseguridad.

*Ambiente controlado.* Es cualquier área donde se controlan las partículas y microorganismos a niveles especificados.

En un ambiente no controlado, se forman partículas de aerosoles provenientes de diversas fuentes que pueden vehiculizar microorganismos. No todas las partículas presentes en el aire, transportan microorganismos, la relación entre las partículas viables y no viables es muy variable, puede oscilar desde menos de 1/1000 o más de 1/10000.

En las áreas limpias convencionales las partículas submicrónicas se mantienen dispersas y caen muy lentamente a diferentes distancias. La relación de desplazamiento horizontal en relación a la velocidad de una partícula de 10 micrones es de 50 a 1.

En un flujo laminar horizontal con velocidad de aire de 30 m/min, para una caída de 30 cm una partícula de diferente tamaño se desplaza aproximadamente los metros señalados en la Tabla 17.1.

**Tabla 17.1.** Desplazamiento de las partículas en un flujo laminar.

| Tamaño en micrones | Recorrido en metros |
|--------------------|---------------------|
| 1                  | 200                 |
| 3                  | 95                  |
| 5                  | 40                  |
| 10                 | 15                  |

En un flujo laminar la velocidad de la corriente de aire se fija en 27 m/min para impedir la decantación de las partículas.

La clasificación de áreas limpias adoptada para la elaboración de medicamentos y materiales biomédicos de acuerdo a la Federal Standard 209E, se muestra en la Tabla 17.2.

**Tabla 17.2.** Clasificación de áreas limpias (Federal Standard 209E).

| Clase de ambiente<br>(Nº de partículas/pie <sup>3</sup> ) | Partículas /m <sup>3</sup> (0,5 – 5 u) | UFC/m <sup>3</sup> |
|---|--|--------------------|
| 100   | 3.530                                  | < 3                |
| 10.000  | 353.000                                | < 20               |
| 100.000   | 3.530.000                              | < 500              |

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la permanencia y supervivencia de los microorganismos. Algunos se encuentran en forma de células vegetativas, pero lo más frecuente son las formas esporuladas debido a que sobreviven mejor en atmósferas secas. En el aire se aíslan bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, así como actinomicetos. Además son frecuentes los bacilos pleomórficos Gram positivos de los géneros *Corynebacterium*, *Arthrobacter* y otros. Los bacilos y cocos Gram negativos se encuentran en escasa proporción debido a que no sobreviven a la desecación.

Respecto a los hongos, los que más frecuentemente se aíslan son hongos filamentosos como *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* o *Mucor* y levaduras como *Rhodotorula* o *Candida*.

### Métodos de monitoreo

El objetivo del monitoreo es obtener estimaciones representativas de biocarga en el ambiente. De los diferentes métodos de captación de microorganismos ambientales pueden emplearse sistemas activos, como el método que utiliza muestreadores de impacto que capta un volumen conocido de aire el cual impacta en una placa de Petri con un medio adecuado de cultivo. Este procedimiento es cuantitativo. También pueden utilizarse sistemas pasivos, como ser la exposición de placas de Petri con medio de cultivo apropiado durante 60 minutos en el área a analizar, pero en este caso los resultados, si bien no son cuantitativos, señalan las condiciones higiénicas del lugar. No obstante, hay una relación bastante aproximada entre uno y otro método.

El monitoreo debe ser dinámico no solo en su frecuencia, sino en la ubicación apropiada de los sitios a monitorear.

Las áreas críticas requieren de mayor vigilancia. Una clase 100 (Tabla 17.2) debe monitorearse en cada tarea, una clase 10.000 se monitorea diariamente. Una clase 100.000 puede monitorearse semanalmente.

Todo dependerá de la naturaleza del producto y tipo de proceso involucrado. Cuanto mayor es la intervención del personal mayor importancia tendrá el monitoreo.

La técnica que se emplea rutinariamente en análisis microbiológico ambiental es la **sedimentación por gravedad**.

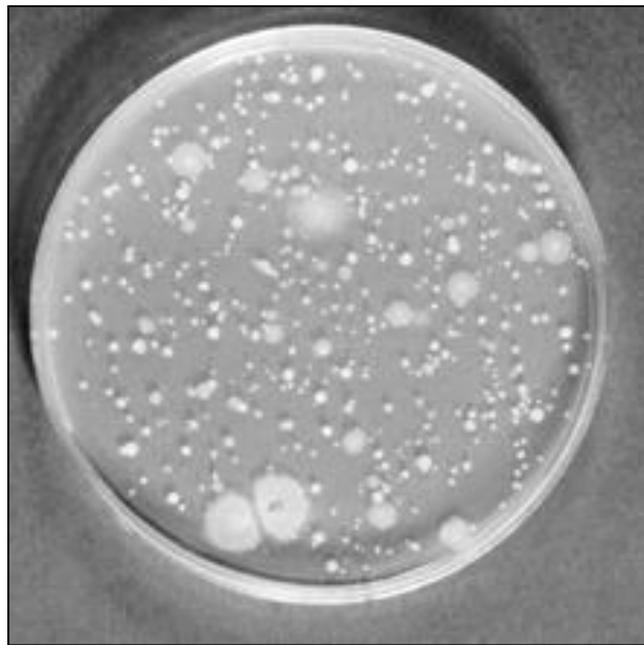
Este método permite determinar la carga microbiana de un ambiente problema. Los microorganismos suspendidos en el polvo o aerosoles sedimentan sobre la superficie de un medio rico, no selectivo o bien en medios selectivos contenidos en placas de Petri. Una vez tomada la muestra mediante la apertura de las placas en el ambiente deseado, estas se incubarán en las condiciones que favorezcan el crecimiento del tipo de microorganismos que deseemos estudiar.

### Resultados

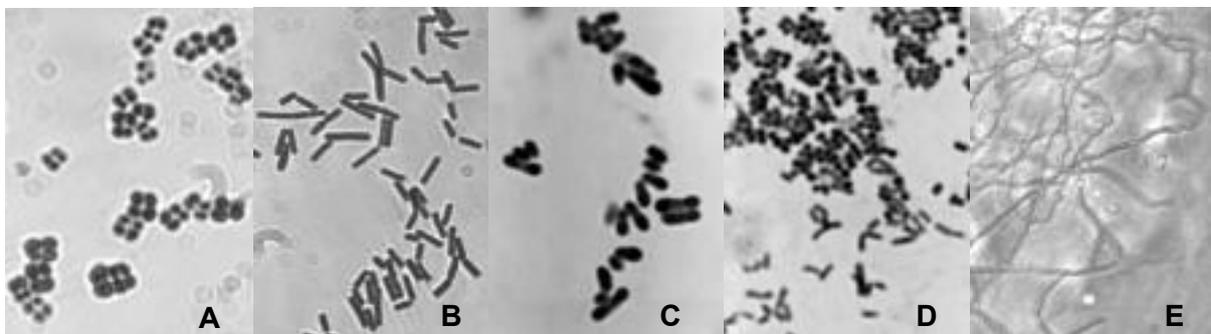
Se observará la aparición paulatina de diversos tipos de colonias. Aparecerán en primer lugar colonias bacterianas y al cabo del segundo o tercer día de incubación se observarán las colonias de levaduras, que se asemejan a las bacterianas, así como las características colonias algodonosas de los hongos filamentosos (Figura 17.1). Se anotarán las características más importantes de las colonias bacterianas y fúngicas, y se realizará un estudio microscópico de cada una de ellas.

La *observación microscópica de las colonias bacterianas* se realizará mediante una tinción de Gram. Se observará todo tipo de microorganismos, con predominio de cocos y bacilos esporulados Gram positivos, frecuentemente dispuestos respectivamente en sarcinas y en

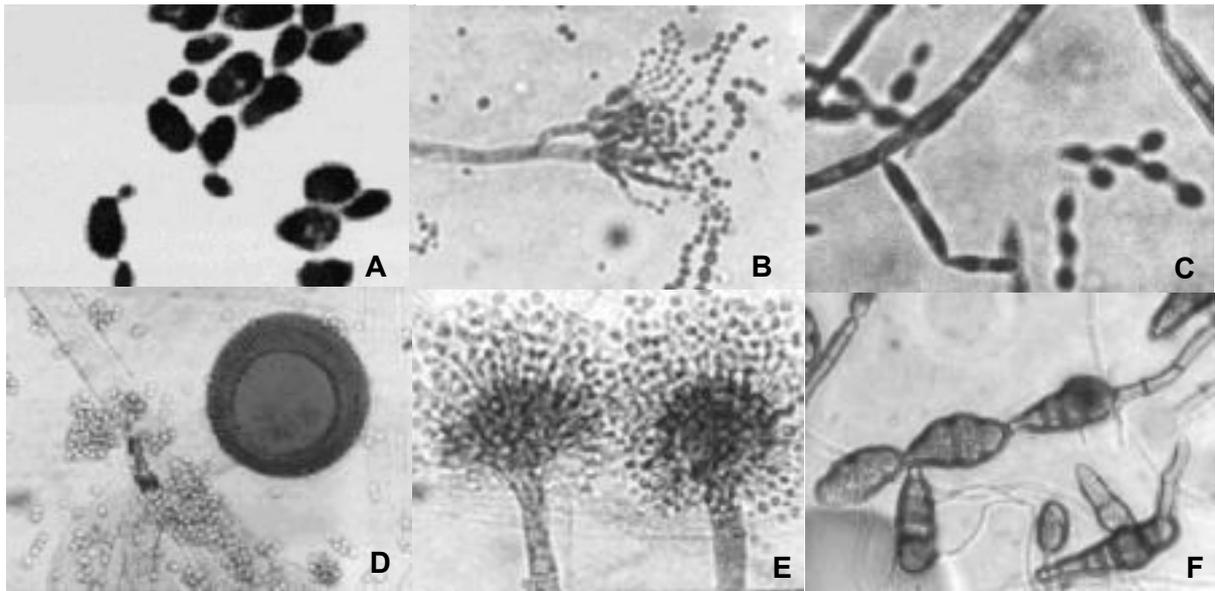
cadena (Figura 17.2). Los bacilos irregulares que se observarán tienen pared de Gram positivos, pero se decoloran fácilmente y en las preparaciones aparecerán como Gram negativos o teñidos de forma irregular, en bandas o en los extremos. Estos bacilos son muy pleomórficos unos tienen forma de maza, se agrupan en empalizada o recordando letras chinas; otros poseen un ciclo de crecimiento de bacilo a coco y algunos originan filamentos. La *observación microscópica de hongos filamentosos* se realizará mediante montaje con azul de lactofenol. Para ello, se apoya una tira de cinta adhesiva transparente sobre el micelio, con el fin de que las hifas y esporas queden adheridas. Se deposita una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos y se adhiere la cinta con el micelio. El color azul facilita la visualización del micelio en fresco (Figura 17.3).



**Figura 17.1.** Control microbiológico ambiental. Aspecto típico de una placa de sedimentación por gravedad mostrando la diversidad microbiana de un ambiente.



**Figura 17.2.** Morfología de algunas bacterias comunes en el aire al microscopio óptico. A. *Micrococcus*. Tinción de Gram (obj. 100x). B. Bacilos regulares (*Bacillus*) en tinción Gram (obj.100x). C y D. Bacilos irregulares: Corineformes (C) y *Arthrobacter* (D). Tinción de Gram (obj. 100x). E. Actinomiceto. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x).



**Figura 17.3.** Morfología de hongos al microscopio óptico.

A. Levaduras en tinción con cristal violeta (obj. 100x). B. *Penicillium*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). C. *Cladosporium*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). D. *Mucor*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). E. *Aspergillus*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). F. *Alternaria*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x).

## Desarrollo Práctico N° 17

### Consignas:

1. Realizar el control microbiológico bacteriano empleando una placa de PCA, Agar nutritivo o Agar Tripticasa Soya.
2. Realizar el control microbiológico fúngico empleando una placa de Hongos y Levaduras con Cloranfenicol.
3. Recuento e interpretación de los resultados.

### Materiales necesarios

- Asa de siembra
- Mecheros
- Placa de Petri con agar PCA
- Portaobjetos
- Colorantes para tinción simple y de Gram
- Solución de azul de lactofenol azul de algodón
- Cinta adhesiva transparente
- Microscopio y aceite de inmersión

### Actividades

1. Llevar la placa cerrada, con cuidado de que no se abra durante el transporte, al ambiente cuya carga microbiológica se desee evaluar.
2. Retirar la tapa y dejar la placa abierta, durante 60 minutos, en un lugar representativo de dicho ambiente.
3. Pasado este tiempo, cerrar la placa e incubarla a la temperatura adecuada en función del tipo de microorganismos que se desea evaluar.

En caso de una evaluación micológica, se incuban las placas a 25 – 30°C durante 2 a 5 días. En caso de una evaluación bacteriológica, se incuban las placas a 35 – 37°C durante 24 a 72 horas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guía de Prácticas de Microbiología. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Año 2004/2005.
- De Aquino, Miguel. Saneamiento. Higiene y Sanidad. Ediciones Héctor A. Macchi.

## Trabajo Práctico N° 18

### MICOLOGÍA

#### Objetivos

- Valorar la importancia del estudio micológico.
- Conocer las técnicas de manejo de cepas fúngicas: Subcultivo e identificación.
- Reconocimiento y caracterización de géneros de hongos contaminantes comunes del ambiente mediante la observación macroscópica y microscópica.

#### Introducción

Los hongos son organismos con núcleo, portadores de esporas, aclorófilos, que por lo general se reproducen sexual y asexualmente, y cuyas estructuras somáticas por lo común filamentosas y ramificadas están típicamente rodeadas por una pared celular que contiene: celulosa, quitina o ambas.

#### Importancia del estudio de los hongos

Los hongos pueden ser muy útiles, proporcionándonos:

1. Alimentos: champiñones, fermentaciones (cerveza, vino, pan, roquefort, salsa de soja).
2. Sustancias químicas útiles: ácido cítrico, ácido gálico (tintas), resinas, hormonas, vitamina D.
3. Enzimas de elevada especificidad: amilasa, pectinasas, proteasas.
4. Antibióticos.
5. Biorremediación.

Los hongos pueden ser perjudiciales causando deterioro de alimentos y objetos diversos. Son responsables de entidades clínicas como ser:

1. Micosis: enfermedades producidas por hongos: superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas.
2. Micotoxicosis: producidas por la ingestión de metabolitos secundarios tóxicos biosintetizados por hongos.
3. Micetismo: ingestión de setas venenosas.
4. Alergia por hongos.

#### Caracteres generales

##### Estructuras somáticas

- **Hifa** (gr. hyphae: tejido): Unidad estructural de los hongos, un filamento tubular. Constituido por 
  - una pared tubular delgada
  - un protoplasma
    - no tabicado, continuo
    - tabicado, con septos
- **Micelio** (gr. myke: seta, hongo): masa de hifas que constituye el cuerpo del hongo.
- **Esporas**: son pequeñas unidades de propagación producidas por la mayoría de los hongos y sirve para producir nuevos individuos de la misma especie.

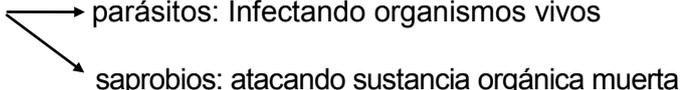
##### Estructuras reproductivas

Reproducción es la formación de nuevos individuos que tienen todas las características de la especie.

- **Asexual** (somática o vegetativa): no incluye la unión de núcleos, células sexuales u órganos sexuales. Puede ser por: fragmentación del soma, fisión, gemación, producción de conidias, etc.
- **Sexual**: requiere la unión de dos núcleos compatibles. Consta de tres fases: plasmogamia, cariogamia, meiosis.

La plasmogamia reúne dos núcleos haploides en una célula; la cariogamia los reúne en uno diploide, el núcleo cigótico; y la meiosis restablece la condición haploide en los cuatro núcleos que resultan de ella.

### Nutrición y crecimiento

Los hongos obtienen su alimento como 

Requieren:

- **Hidratos de carbono:** glucosa, sacarosa, maltosa, etc.
- **Nitrógeno:** a partir de sustratos orgánicos o inorgánicos, sintetizan sus propias proteínas.
- **Minerales:** C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe, Zn.
- **Vitaminas:** algunos deficientes en tiamina y biotina.

Los excesos de nutrientes almacenan como glucógeno o en forma de gotitas de aceite.

### Temperatura de crecimiento

La temperatura óptima oscila entre 20°C y 30°C. La mayoría crecen entre 0°C y 35°C.

### Aislamiento de hongos del medio ambiente

La importancia de reconocer los hongos contaminantes comunes radica en que se encuentran en el ambiente y estos pueden crecer sobre medios inoculados con distinto tipo de materiales procedentes de lesiones humanas, alimentos, o bien pueden contaminar un cultivo puro.

Los contaminantes comunes del ambiente más frecuentemente observados son: Deuteromycetes, Fungi imperfecti u Hongos imperfectos, Zygomycetes, Levaduras.

### Taxonomía

Una de las clasificaciones más aceptadas es la que divide el **Reino Fungi** en dos divisiones: *Mixomycota* y *Eumycota*.

*Mixomycota* son hongos inferiores de pared delgada del tipo gelatinosos.

Los *Eumycota* son considerados hongos superiores, de acuerdo a su tipo de reproducción sexual o asexual, están constituidos por 5 subdivisiones: *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina* o *Fungi imperfecti* por no encontrarse a estos últimos formas de reproducción sexual.

La diferencia taxonómica de los grupos fúngicos se basa en los aspectos que se resumen en la clave de identificación.

### Clave de identificación. Diferenciación taxonómica de los grandes grupos fúngicos.

1a. Colonias formadas por células con capacidad de gemación, generalmente carentes de micelio → **LEVADURAS**

1b. Colonias con abundante micelio vegetativo. Presencia de conidios o de esporas → 2

2a. Presencia de ascosporas → **ASCOMYCETES**

2b. Presencia de basidiosporas → **BASIDIOMYCETES**

2c. Ausencia de ascosporas o basidiosporas → 3

3a. Micelio no septado o con pocas septas. Las esporas se forman endógenamente en esporangios → **ZIGOMYCETES**

3b. Micelio septado. Los conidios no se originan en esporangios, sino a partir de células especializadas → **DEUTEROMYCETES**

### DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES FÚNGICOS AMBIENTALES

#### DEUTEROMYCETES

En la clase *Deuteromycetes* u *Hongos imperfectos* se incluyen todos aquellos hongos que poseen micelio septado de los cuales solo se conoce su forma asexual o anamorfa. Cuando se les conoce la fase sexuada o teleomorfa la mayoría se encuentran relacionados con los *Ascomycetes* y otros con los *Basidiomycetes*.

En esta clase se clasifican la mayoría de la especies fúngicas de interés como importantes contaminantes de los alimentos, muchos de los cuales son capaces de elaborar y acumular metabolitos secundarios tóxicos o micotoxinas.

Son saprófitos pero entre ellos se encuentran algunos que son parásitos y causan daño a vegetales, animales y al hombre. Poseen micelio septado. La propagación tiene lugar por medio de conidios, elementos de propagación asexuales, inmóviles. Son de tamaño y formas distintas que pueden formarse individualmente, sincrónicamente o en cabezas características. Las hifas fértiles se denominan conidióforos.

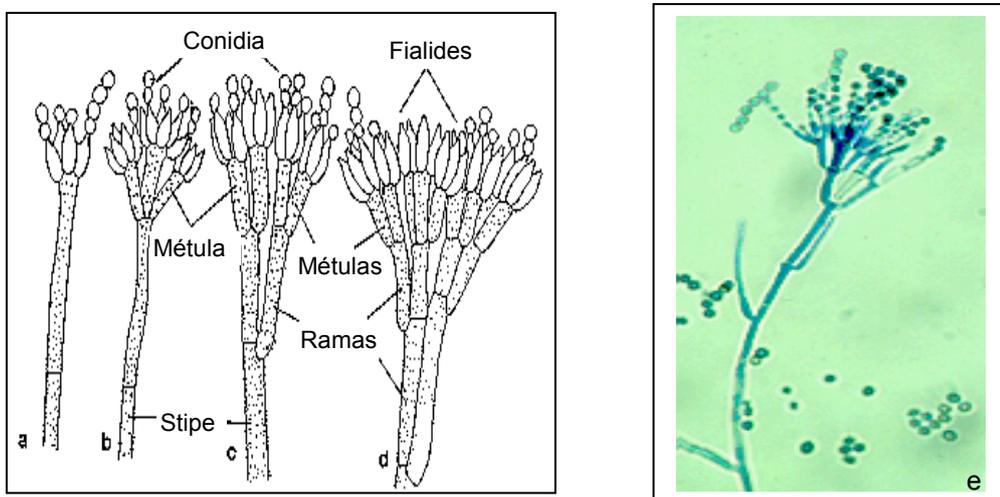
La mayoría esporulan adecuadamente en agar Sabouraud, Czapeck, extracto de malta, incubados a 25 - 28°C durante 7 - 10 días.

Los géneros más frecuentes son: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Escopulariopsis*, *Trichotecium*, *Fusarium*, etc.

- **Penicillium**

**Observación macroscópica:** la colonia compacta de crecimiento lento (28 mm de diámetro en 8 días), es al principio blanca, pero después toma color verde azulado y aspecto muy polvoriento debido a la abundante producción de conidios a partir del micelio aéreo.

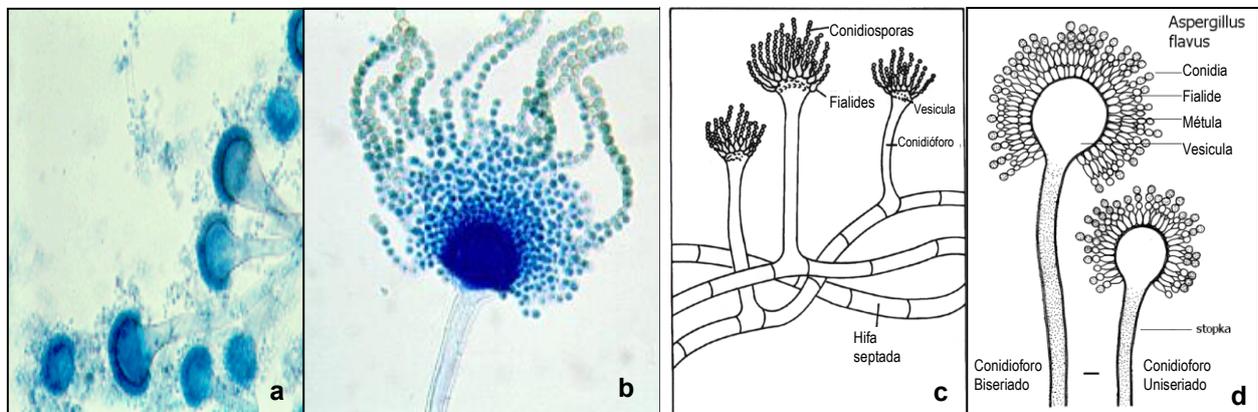
**Observación microscópica:** las hifas portadoras de conidios forman el pincel o cepillo. Los conidios aparecen en cadenas no ramificadas y parten de los extremos de los esterigmas los cuales se hallan dispuestos en verticilio, en los extremos de pequeñas pirámides o métulas que nacen de las ramas, del conidióforo (Figura 18.1).



**Figura 18.1.** *Penicillium*: a) Monoverticilados, b) Biverticilados, c - d) Terverticilados y e) Foto-micrografía.

- **Aspergillus**

**Observación macroscópica:** la colonia crece rápidamente (50 mm. de diámetro en 8 días), es al principio blanca variando la pigmentación posteriormente de acuerdo a la especie. Por ejemplo: en el *Aspergillus niger* se torna negra; en el *Aspergillus fumigatus* se torna verde-grisácea, etc.



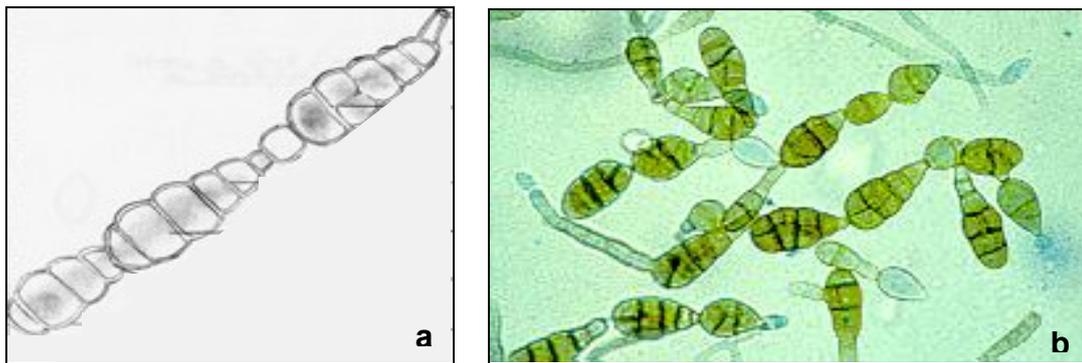
**Figura 18.2.** *Aspergillus*: a y b) Fotomicrografías, c) *A. fumigatus* y d) *A. flavus*.

**Observación microscópica:** la estructura portadora de conidios es una hifa alargada, no tabicada ni ramificada, que nace de una célula pie, en el micelio. Se ensancha en el extremo formando una vesícula, productora de esterigmas (disposición que varía de acuerdo a la especie). En el *Aspergillus niger* y *A. flavus* los esterigmas cubren totalmente la vesícula y en el *Aspergillus fumigatus* cubren la mitad de la vesícula. Los conidios parten de los extremos de los esterigmas, formando cadenas no ramificadas (Figura 18.2).

- **Alternaria**

**Observación macroscópica:** la colonia de crecimiento rápido (40 mm de diámetro en 4 días), desarrolla un micelio corto, gris al principio, después negra con periferia grisácea. El reverso de la colonia es negro.

**Observación microscópica:** a partir de los extremos de los conidióforos se producen los conidios muriformes típicos en cadena, de color oscuro y con tabicaciones longitudinales y transversales. Cualquier célula del conidio puede producir un tubo germinal (Figura 18.3).

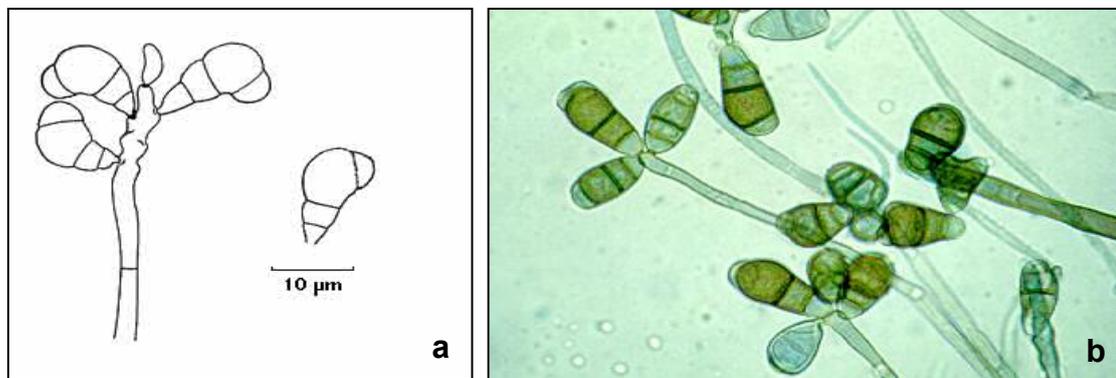


**Figura 18.3.** *Alternaria*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Curvularia**

**Observación macroscópica:** semejante al anterior.

**Observación microscópica:** posee conidios pardos con tabicaciones transversales (Figura 18.4).

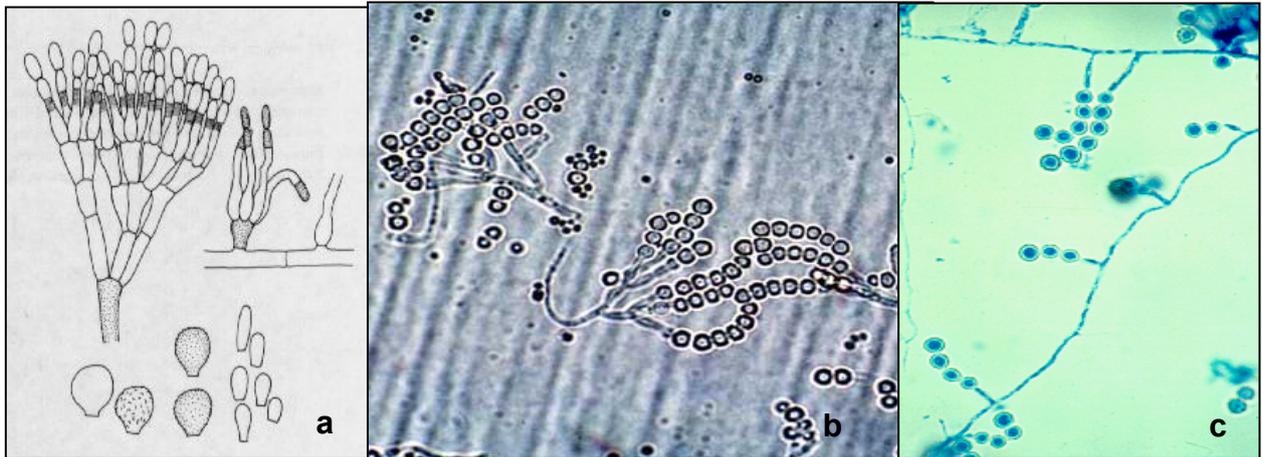


**Figura 18.4.** *Curvularia*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Scopulariopsis**

**Observación macroscópica:** colonia de crecimiento lento (30 mm. de diámetro en 9 días), es al principio membranosa, rugosa y sin vellosidades, hasta que aparecen hifas aéreas y conidios que dan al cultivo aspecto polvoriento y color pardo claro.

**Observación microscópica:** las hifas portadoras de racimos de conidios se parecen superficialmente al pincel del *Penicillium*. Los esterigmas, que sostienen cadenas no ramificadas de conidios de pared rugosa, pueden agruparse en las ramas de un conidióforo corto (Figura 18.5b) o aparecer aisladas a lo largo de las hifas aéreas (Figura 18.5c). Característicamente los conidios se vuelven más grandes a medida que se alejan de la célula conidiógena. Los conidios tienen forma característica de limón (Figura 18.5a).



**Figura 18.5.** *Scopulariopsis*: a) Esquema, b y c) Fotomicrografía.

- **Trichotecium**

*Observación macroscópica*: hongo de crecimiento rápido (70 mm. de diámetro en 9 días) que produce micelio aéreo algodonoso blanco que gradualmente toma color rosado.

*Observación microscópica*: conidióforo no ramificado, largo, delgado, portadores en su extremo de racimos de conidios bicelulares, piriformes de paredes lisas (Figura 18.6).

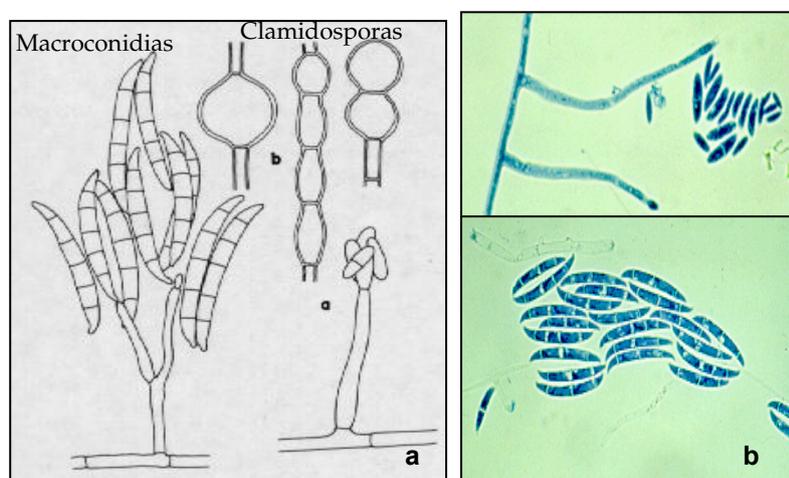


**Figura 18.6.** *Trichotecium*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Fusarium**

*Observación macroscópica*: hongo de crecimiento rápido, al principio blanco algodonoso, pero rápidamente algunos desarrollan color rosa intenso en el centro y rosado claro en la periferia.

*Observación microscópica*: ramas cortas de hifas dan origen a conidios verticilados de los cuales parten conidios multitabacados, largos en forma de hoz o de media luna, terminados en punta, típico del género (Figura 18.7).

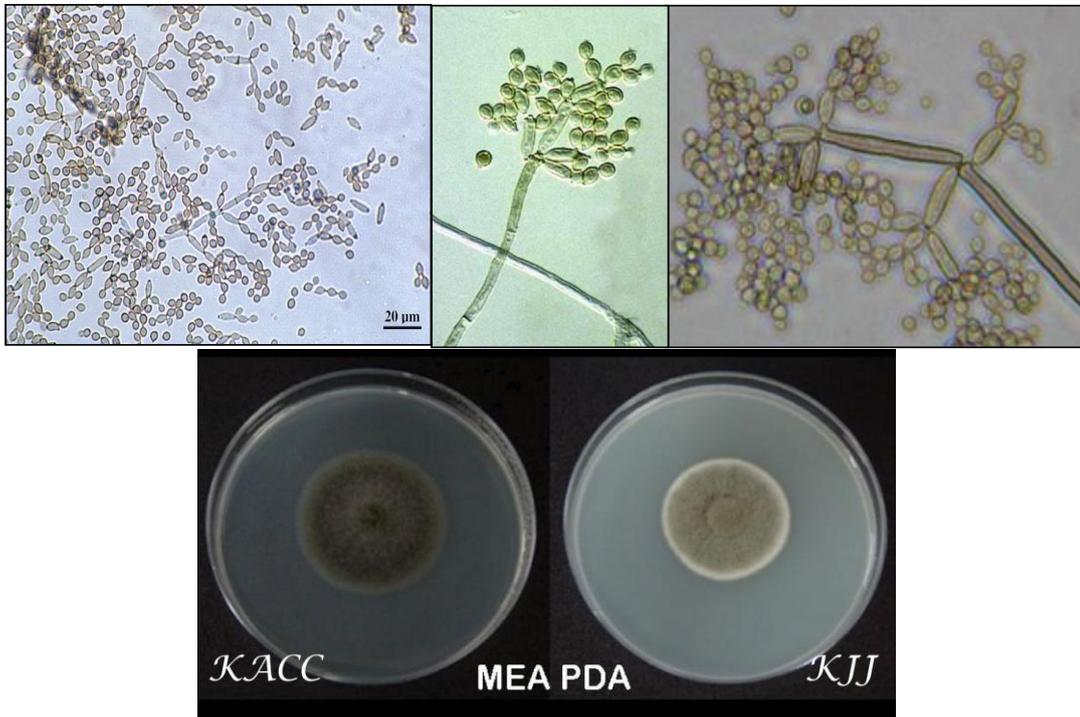


**Figura 18.7.** *Fusarium*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Cladosporium**

*Observación macroscópica:* hongo de crecimiento rápido, de aspecto aterciopelado, puede presentar colores que van desde el azulado o verde petróleo en el anverso (semejando colonias de *penicillium*), algunas veces marrón oscuro pero que siempre son negras en el reverso. Son contaminantes comunes del suelo, plantas y elementos de deterioro.

*Observación microscópica:* ramas cortas de hifas dan origen a cadenas de conidios ovalados a esferoidales que característicamente se disponen en aspecto arborescente (Figura 18.8).



**Figura 18.8.** *Cladosporium*: Fotomicrografías (arriba). Aspecto de las colonias en MEA y PDA.

## ZIGOMYCETES

Los Zigomycetes habitan en el agua, en el suelo, sobre cualquier sustrato que contenga sustancia orgánica (cáscara de frutas, etc.) o se encuentran constituyendo parte de la microflore atmosférica de diversos hábitats. Pueden ser parásitos y saprobios, algunos de gran importancia económica, como ciertas especies que son utilizadas en las industrias de las fermentaciones, mientras que unas pocas ocasionan enfermedades en los animales y en el hombre. Se caracterizan por poseer un micelio cenocítico (no tabicado). El único septo que se forma de manera constante es el que separa los órganos especializados como el esporangio y zigosporas del micelio estéril. En algunos géneros aparecen septos en el micelio, pero este no es un carácter constante y es poco frecuente.

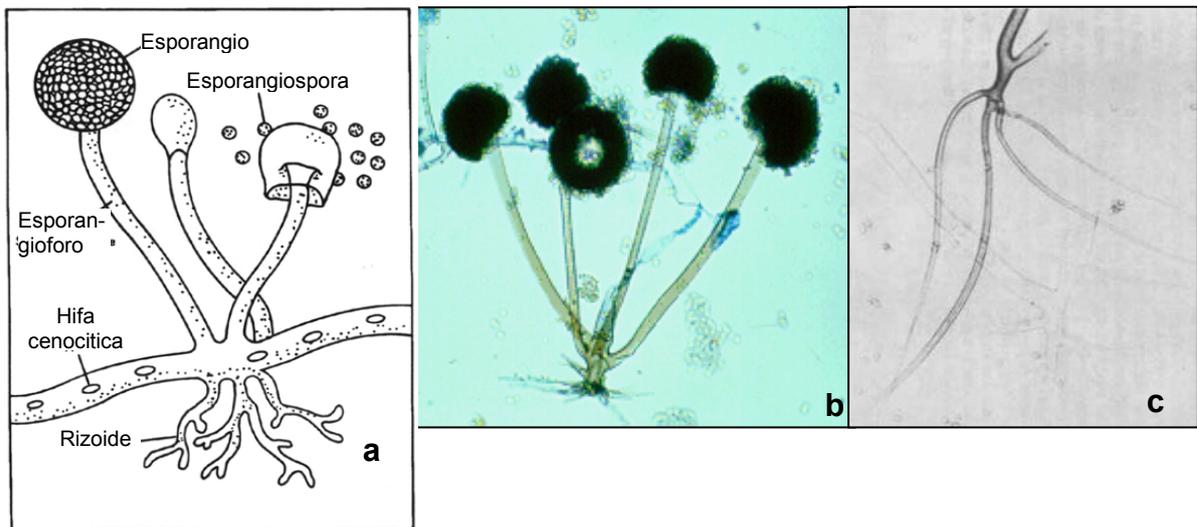
La reproducción asexual tiene lugar por medio de esporangiosporas que se origina de forma endógena a partir de esporangios globosos o piriformes con o sin columela o en merosporangios. Algunos géneros se caracterizan por poseer una apófisis. Otras estructuras son los estolones o hifas especializadas que se adhieren al sustrato por medio de los rizoides. La reproducción sexual tiene lugar por fusión de dos gametangios multinucleados y de ello se origina una zigospora de color amarillento o marrónáceo en ocasiones negruzca, cubierta de espinas u otro tipo de proyecciones externas. Las dos partes de la hifa que sostiene a la zigospora reciben el nombre de suspensores.

Los géneros más frecuentes son: *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, etc.

- **Rhizopus**

*Características macroscópicas:* el crecimiento es voluminoso y rápido, filamentoso, grueso y lanoso. Micelio blanco que se torna gris esparcido con puntos negros o marrones (esporangios).

**Características microscópicas:** el micelio es no septado y sin color, el cuerpo de fructificación consiste en largos tallos (esporangióforos) sobremontados por esporangios esféricos. Los esporangios son de paredes oscuras, cuando maduran presentan una columella y están llenos de esporas hialinas esféricas. Los esporangióforos no son ramificados y aparecen en racimos en disposición opuesta al rizoide a lo largo de una rama horizontal (estolón) (Figura 18.9).

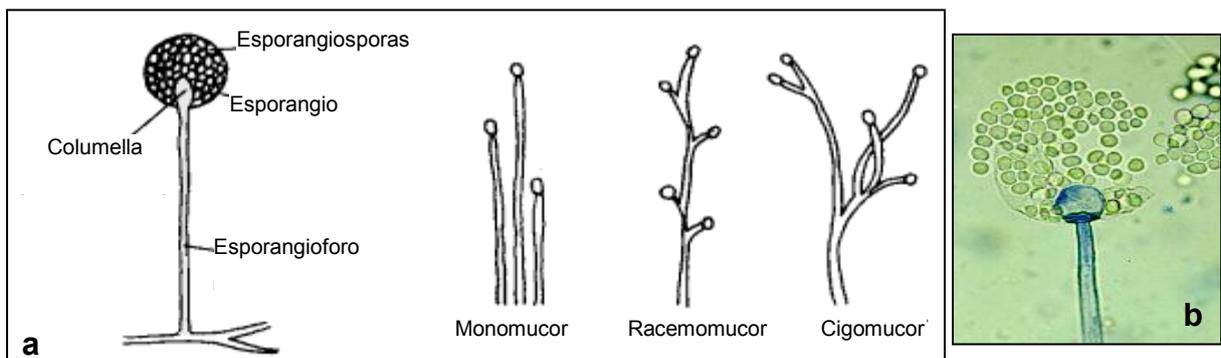


**Figura 18.9.** *Rhyzopus*: a) Esquema y b) Fotomicrografía, c) Fotomicrografía de un rizoide.

- **Mucor**

**Características macroscópicas:** la colonia es de crecimiento rápido llenando la caja de Petri en 5 a 7 días con un micelio aéreo, esponjoso que es primero blanco y luego se torna gris o marrón.

**Características microscópicas:** el micelio es no septado, sin color y sin rizoide (el micelio viejo puede mostrar una irregularidad en las paredes que semejan septas). El esporangióforo se eleva del micelio grueso y erecto como un tallo. Puede o no estar ramificado con un esporangio esférico terminal con muchas esporas. La columella está siempre y pueden quedar remanentes de la pared esporangial después que las esporas han salido liberadas, formando el collarete. Las zigosporas son producidas por algunas especies (Figura 18.10).

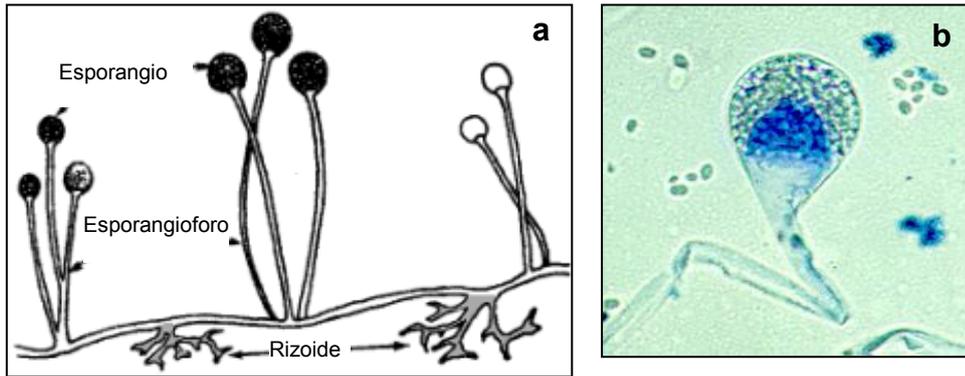


**Figura 18.10.** *Mucor*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Absidia**

**Características macroscópicas:** colonia blanca al principio, luego gris pálido, vellosa y de crecimiento muy rápido, prospera más que la mayoría de los hongos en los medios bacteriológicos.

**Características microscópicas:** el género difiere en varios aspectos del *Rhyzopus*. Los rizoides y estolones no están claramente diferenciados; los esporangióforos nacen de los estolones y no de los puntos de unión de los rizoides. Los esporangios son relativamente pequeños y piriformes, el rango más característico de todo es la presencia de una apósis bien definida, es decir un pie o una prominencia infundibuliforme del esporangio en el punto en que se unen las paredes de este y la columella (Figura 18.11).

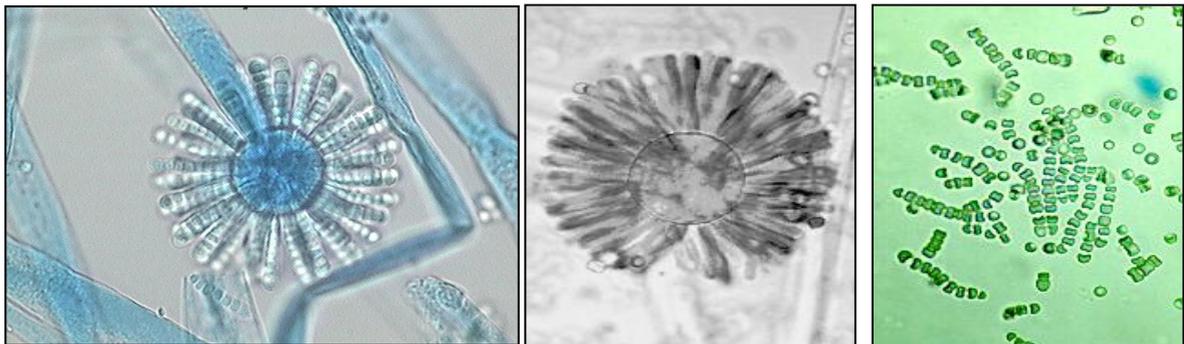


**Figura 18.11.** Absidia: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Syncephalastrum**

*Características macroscópicas:* la colonia es de crecimiento rápido y exuberante, semejando a la colonia de *Rhizopus nigricans*.

*Características microscópicas:* las esporas se forman en largos esporangios tubulares radiados desde un engrosamiento en el extremo del esporangióforo. Cuando se hacen preparados y se observan a pequeño aumento las cabezas muestran un sorprendente parecido a las del *Aspergillus*. A gran aumento se ven las cadenas de esporas encerradas en membranas tubulares, y si sigue el desarrollo de las estructuras de esporulación, se observarán que las esporas se forman exactamente como un tipo normal de esporangio (Figura 18.12).

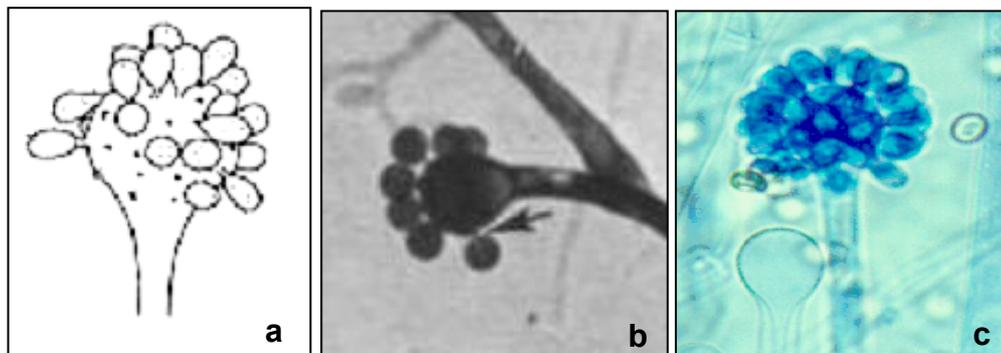


**Figura 18.12.** Fotomicrografías de *Syncephalastrum*.

- **Cunningamella**

*Características macroscópicas:* micelio blanco, flocoso, ligeramente engrosado y ramificado.

*Características microscópicas:* las hifas son ligeramente engrosadas, el eje principal así como las ramas laterales terminan en cabezas esféricas ornamentadas con pequeñas hinchazones que son el punto de inserción de los conidios. Los conidios son esféricos u ovals frecuentemente con una irregularidad externa, la membrana externa es espinosa y con agujas de cristal. Las clamidosporas son globosas intercalándose en el micelio (Figura 18.13).



**Figura 18.13.** *Cunningamella*: a) Esquema, b y c) Fotomicrografía.

## Desarrollo Práctico N° 18

### Consignas

1. Observación de las características macroscópicas de las colonias fúngicas.
2. Reconocimiento de colonias de mohos y levaduras.
3. Identificación genérica de colonias de mohos (hongos filamentosos).

### Materiales necesarios

- Asa en L
- Mecheros
- Placa de Control ambiental en HyL
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Solución de azul de lactofenol azul de algodón
- Cinta adhesiva transparente
- Microscopio y aceite de inmersión

### Actividades

1. Recuento de contaminantes ambientales: bacterias en placas de PCA y hongos en placas de HyL.
2. Observación y reconocimiento de hongos contaminantes comunes provistos por la cátedra. Describir y esquematizar.
3. Observación y clasificación genérica de contaminantes comunes aislados en sus placas de control ambiental.
4. Volcar los resultados en la tabla en pizarra: resultados de los recuentos y el nombre de las cepas fúngicas identificadas.

### Consideraciones generales

Las técnicas que se usan en micología son en general similares a las utilizadas en bacteriología. Hay sin embargo diferencias que son importantes de puntualizar:

- En todo momento, tanto por la protección de los estudiantes como por la seguridad y mantenimiento de los cultivos puros, es necesario trabajar bajo condiciones de esterilidad.
- Se usa un ansa con alambre de nicrón cuyo extremo puede adoptar la forma de aguja, o forma de L, gancho, especialmente para transferir la fase micelial. Un par de agujas para apartar las densas masas de micelio y separar partes sobre el portaobjeto antes de la observación microscópica.
- Es preferible usar tubos de ensayo de diámetro considerable a tubos angostos. Esto permite una base grande de agar en el fondo del tubo, la que evita que se deseque el medio durante la incubación de varias semanas a que se somete.
- Se debe trabajar sobre una mesada perfectamente libre de otro material, previamente desinfectada con solución antiséptica de preferencia que contenga yodo. Se aconseja colocar sobre la misma, en el área de trabajo, papel de filtro u otro absorbente con desinfectante.
- Trabajar siempre al lado de un mechero, si es posible dentro de cabinas de seguridad biológica y evitar todo tipo de corriente de aire que favorezcan la dispersión de las esporas y la contaminación de los cultivos.
- Finalizada la tarea se debe descartar el material en la misma solución antiséptica, solución de fenol al 10% o en su defecto en una solución de agua-lavandina.

*Recordar la desinfección de las mesadas una vez concluido el trabajo.*

## Examen de los cultivos

### • Morfología macroscópica

Observar la morfología de las colonias después de un período de 1 a 3 semanas, tomando nota de las siguientes características:

- Velocidad de crecimiento
- Topografía general (plana, levantada, regular, cerebriforme, etc.)
- Textura (cremosa, pulverulenta, granular, algodonosa, aterciopelada, etc.)
- Pigmentación en la superficie
- Pigmentación en el reverso

Cuando se describe la morfología macroscópica de una colonia siempre deben especificarse el tipo de medio y las condiciones ambientales de los cultivos. Los datos se pueden volcar en el siguiente cuadro.

**Cuadro Nº 1.** Descripción de las colonias.

| Nombre | Medio de cultivo | Velocidad crecimiento | Color en la superficie | Color en el reverso | Topografía | Textura | Bordes |
|--------|------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|------------|---------|--------|
|        |                  |                       |                        |                     |            |         |        |
|        |                  |                       |                        |                     |            |         |        |
|        |                  |                       |                        |                     |            |         |        |

### • Morfología microscópica

**Hongos filamentosos.** Usando técnica estéril, remover una pequeña cantidad de la colonia en estudio con el ansa. Colocar el material sobre una gota de solución fisiológica (SF) o lactofenol azul y separar en partes si es necesario. Colocar el cubreobjeto y observar con objetivo seco de menor aumento, cuando se ha localizado lo que se desea observar, usar el objetivo seco de mayor aumento. Si hay esporas o fructificaciones es posible identificar el cultivo por esta observación microscópica. A menudo hay que recurrir a otros procedimientos como ser:

- Preparación de microcultivos, para determinar la relación de las esporas con los conidióforos.
- Usar medios especiales para inducir esporulación o producir una particular estructura o un especial tipo de cultivo.
- Usar pruebas fisiológicas o nutricionales para determinar las características fisiológicas del hongo aislado que permitan su identificación.
- En algunos casos es necesario hacer pruebas de patogenicidad en animales para identificar un cultivo.
- Se puede recurrir a distintas técnicas de coloraciones, realizando previamente la fijación del extendido.

**Cuadro Nº 2.** Descripción microscópica.

| Nombre | Tipo de micelio | Tipo de esporo | Forma de fructificación |
|--------|-----------------|----------------|-------------------------|
|        |                 |                |                         |
|        |                 |                |                         |
|        |                 |                |                         |

### Hongos levaduriformes

Preparación de los extendidos para la observación microscópica de levaduras:

- Tomar con un ansa ojal, previamente esterilizada a la llama una pequeña porción de la colonia y extenderla sobre una gota de SF, agua o lactofenol azul, en el portaobjeto.
- Colocar un cubreobjeto y realizar la observación a bajo aumento.

Se puede realizar tinción de Gram de los extendidos de las colonias levaduriformes de la misma manera que se procede con las bacterias

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman-Roberts. Micología práctica de laboratorio. Ed. Panamericana. 1987.
- Piontelli, E.; Toro, M.A. Manual de Identificación para Microhongos Comunes en Alimentos. Cátedra de Micología. Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso. Chile. 2003.
- Abarca Salat, L. Diagnóstico de Laboratorio de Micología. Departamento de Patología y Producciones Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 1992.
- Deacon, J. Introducción a la Micología Moderna. Departamento de Microbiología. Universidad de Edimburgo. Limusa. Noriega Editores. 1993.
- Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Micología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Editorial Universitaria de Misiones. 2005.

## Trabajo Práctico N° 19

### TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

#### Objetivos

- Conocer las principales técnicas inmunológicas utilizadas en la detección de sustancias de interés.
- Comprender los mecanismos de funcionamiento de las técnicas analíticas basadas en reacciones Ag-Ac.
- Realizar determinaciones de sustancias mediante las técnicas analíticas inmunológicas más comunes.

#### Fundamento de las técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas se basan en la interacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac), que constituyen asociaciones bimoleculares de alta afinidad y especificidad. La especificidad de un Ac por su Ag ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de ensayos que pueden ser utilizados para la detección de cualquiera de los dos componentes (Ag o Ac) en una mezcla o fluido biológico.

Dada la especificidad de la reacción Ag-Ac, esta ha sido utilizada con magníficos resultados en la diferenciación e identificación de microorganismos, hematíes, antígenos solubles, así como en la investigación y cuantificación de anticuerpos séricos, sobre todo con fines de diagnóstico.

#### Utilidad de las técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas son herramientas utilizadas en:

1. El campo de la microbiología para el diagnóstico de enfermedades causadas por distintos microorganismos (bacterias, virus, parásitos, hongos), control de la evolución de la enfermedad y su tratamiento. Además en la tipificación de sub-especies microbianas pertenecientes a un mismo género, ejemplo: *E. coli* O157:H7.
2. En el campo de la epidemiología se usan técnicas inmunológicas para confirmar u orientar un brote epidémico, una situación de endemia, etc.
3. En el campo de la inmunología se evalúan fundamentalmente respuestas y funciones inmunológicas del individuo, inmunodeficiencias o alteraciones del sistema inmune (hipersensibilidad o alergias).
4. Pruebas diagnósticas no infecciosas, son usadas también para estudios no relacionados a infecciones como son la determinación de grupos sanguíneos, pruebas de histocompatibilidad en transplante de órganos, diagnósticos de embarazo, enfermedades endócrinas, pruebas de paternidad.
5. Identificación de moléculas de interés médico o biológico.
6. Desarrollo de Kits de detección y cuantificación de biomoléculas de interés humano y animal, que se hallan en muy pequeñas cantidades para lograrlo por otros métodos. Ejemplo: Micotoxinas en alimentos y piensos.

La confiabilidad y reproducibilidad de las técnicas inmunológicas dependerán de la calidad de los reactivos utilizados y del estricto control y valoración de los elementos y variables que intervienen en las pruebas.

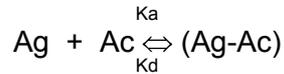
#### Interacción antígeno-anticuerpo

La interacción entre un Ac y su Ag correspondiente involucra a varias uniones no covalentes entre el determinante antigénico o epítope del Ag y la región variable o paratope de la molécula de Ac. Dado que este tipo de interacciones son reversibles, las asociaciones Ag-Ac pueden ser disociadas en condiciones particulares. Factores tales como variaciones de temperatura, concentración salina, el estado físico del antígeno y la valencia de los Ac (multi, bi o monovalente), así como el rango de concentraciones (pg, ug o mg) son factores fundamentales que condicionan la visualización o no del complejo inmune formado.

La unión del antígeno con su anticuerpo específico y la formación del complejo inmune se denomina **interacción primaria**.

Esta interacción se basa en la reacción entre el determinante antigénico o epítotope con la región variable o paratope del anticuerpo. Se conforman estructuras tridimensionales complementarias entre el epítotope y el paratope, por medio de grupos químicos, radicales o de átomos y se establece así la *especificidad reaccional*.

Esta unión es de tipo no covalente, puentes hidrógeno, enlaces electrostáticos, fuerzas de Van der Waalls, etc., y responden a diferentes constantes cinéticas que dan origen a *interacciones reversibles* según sean de asociación (Ka) o de disociación (Kd):



Esta ecuación expresa la tendencia al equilibrio cuya constante (Ke) estará dada por:

$$\text{Ke} = \frac{\text{Ka}}{\text{Kd}} = \frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]}$$

El grado de afinidad de la interacción va a estar determinado por las fuerzas de unión entre el grupo determinante del antígeno y la región complementaria del anticuerpo.

La interacción primaria no es observable a simple vista, por lo que para ponerla de manifiesto se utilizan distintas técnicas inmunológicas.

La interacción secundaria es una consecuencia directa pero no obligada de la interacción primaria.

En un sistema in vitro de Ag y Ac, a la formación de complejos inmunes (*interacción primaria*) le sigue una reacción inespecífica, con la constitución de una red macromolecular tridimensional, que se manifiesta por la aparición de agregados visibles (***interacción secundaria***).

La interacción secundaria va a depender de múltiples variables que están relacionadas al Ag, al Ac y a las condiciones de reacción:

- Antígenos: preferentemente polivalente y poliespecíficos.
- Anticuerpos: bivalentes (Ig G) y heterogéneos para los distintos epitopes del Ag.
- Las condiciones de la reacción se refieren a: presencia de electrolitos, pH neutro, temperatura adecuada (37°C).

En la interacción in vitro de un antígeno con su correspondiente anticuerpo se distinguen dos etapas:

- *La reacción primaria no visualizable.*
- *La reacción secundaria, que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación, la precipitación, etc.*

Los complejos iniciales que se forman rápidamente y sobre los que, dentro de ciertos límites, las variaciones de temperatura y concentración salina tienen poca influencia, se agregan luego para dar diferentes fenómenos visibles cuyas características dependen en gran parte del estado físico del antígeno. Esta etapa se acelera con la temperatura, la agitación y no depende de la concentración salina.

Es importante separar las etapas de la reacción Ag-Ac. Puede ocurrir que se demuestre la presencia de anticuerpo por interacción primaria, pero que este no sea detectable por interacción secundaria. Esto puede deberse a:

- *Variaciones cuantitativas*, ya que para conseguir fenómenos visibles son indispensables determinadas concentraciones de anticuerpo, y
- *Variaciones cualitativas*, inherentes a las propiedades de la clase de inmunoglobulina comprometida en la respuesta inmune, así como las características del ligando en el antígeno.

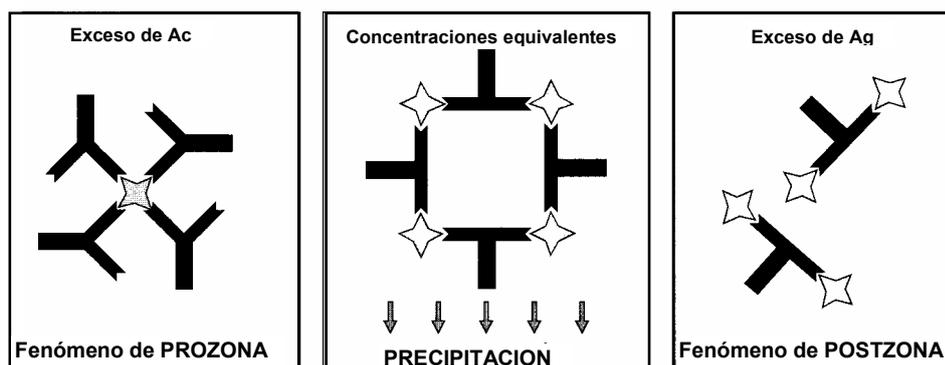
Para que la reacción antígeno anticuerpo sea visible es necesario que la proporción entre ambos sea óptima o equivalente (***ZONA DE REACCIÓN O ZONA DE EQUIVALENCIA***). La formación de los complejos antígeno anticuerpo en una forma visible se explica por la **Teoría del enrejado**, que considera que la composición del precipitado formado es una consecuencia del modo en que anticuerpo y antígeno se han unido. Dada la bivalencia del anticuerpo y la multivalencia del antígeno, las posibilidades de combinación varían según que:

- En la mezcla exista exceso de anticuerpo.

- En la mezcla exista equivalencia de ambos.
- En la mezcla exista exceso de antígeno.

Esto dará origen a tres instancias probables en la aparición de la interacción secundaria, Figura 19.1:

- Fenómeno de prozona*: cuando en la solución hay una concentración relativa muy elevada de Acs con respecto a los antígenos. Hay interacción primaria, no hay interacción secundaria.
- Fenómeno de equivalencia inmunológica*: cuando en la solución hay una concentración adecuada o equivalente (no igual) de Ags y Acs. Además de la interacción primaria, hay interacción secundaria.
- Fenómeno de postzona*: cuando en la solución hay una concentración relativa muy elevada de Ag respecto de la concentración de Ac. Hay interacción primaria, no hay interacción secundaria.



**Figura 19.1.** Influencia de las concentraciones relativas de los reactantes en una reacción de inmunoprecipitación.

### Tipos de técnicas inmunológicas

La respuesta inmune puede ser evaluada mediante técnicas inmunológicas. Estas pueden ser *in vivo* cuando se realizan sobre el paciente o animales de prueba, o *in vitro* cuando se realizan sobre muestras obtenidas del paciente o animales de prueba pero sobre un portabjeto, tubos, placas, etc.

A las técnicas *in vitro*, se las pueden clasificar de acuerdo a:

#### Tipo de inmunidad que evalúan

- Medición de la inmunidad humoral (Acs) o la presencia de Ags. A las técnicas para medir la inmunidad humoral o la presencia de Ag se las denominan técnicas serológicas.
- Medición de la inmunidad celular.

Se estudiarán los Acs en la muestra del paciente (suero o líquidos corporales) con Ag conocidos (reactivos de laboratorio) o Ags en la muestra del paciente contando con antisueros específicos (reactivos de laboratorio).

#### Tipo de incógnitas

Cuando consideramos un diagnóstico de laboratorio (cualquiera sea la técnica), este puede ser directo o indirecto, será una técnica directa cuando nuestra incógnita es el antígeno, y una técnica indirecta cuando la incógnita son los anticuerpos correspondientes (formados en respuesta al antígeno).

#### Tipo de detección

Con las técnicas cualitativas se intenta demostrar la presencia o ausencia de Acs o Ags. Con las técnicas cuantitativas se busca establecer la cantidad o concentración de Acs o Ags según lo que se quiera determinar. Para establecer la cantidad se usan técnicas denominadas semi cuantitativas con las que habitualmente se busca encontrar el título de Acs en el suero del paciente.

*Título del suero*: si se busca Acs en el suero se denomina título de un suero a la mínima cantidad del suero (o sea la mayor dilución del mismo) que reacciona con una cantidad

constante del Ag correspondiente previamente titulado, en forma tal que se hace manifiesta su presencia con una determinada técnica inmunológica.

Para establecer el título de un suero se hacen diluciones seriadas del mismo, se enfrenta al Ag de concentración conocida, observándose hasta la última dilución que resulta positiva y este será el título del suero para dicha prueba serológica.

### Variables inmunológicas

Cuando se analizan las técnicas inmunológicas se deben tener en cuenta dos variables fundamentales como son: *especificidad y sensibilidad*.

*Especificidad*: es la capacidad de una técnica inmunológica de identificar únicamente al Ag o al Ac para la que fue diseñada.

*Sensibilidad*: es la capacidad de una prueba para poner de manifiesto el menor nivel de concentraciones de Acs o Ags.

Las técnicas inmunológicas altamente sensibles tienen la cualidad de detectar muy bajas concentraciones de Acs o Ags, las técnicas poco sensibles necesitan mayores concentraciones de Acs o Ags para poder detectarlos.

En ocasiones, no muy frecuentes, en las que el huésped produce una gran concentración de Acs y que aplicadas las técnicas dan resultados falsos negativos (FR-), esta situación se explica teniendo en cuenta lo que sucede en la interacción secundaria cuando hay un exceso de Acs llamado fenómeno de prozona.

**Tabla 19.1.** Niveles de sensibilidad para algunas pruebas inmunológicas.

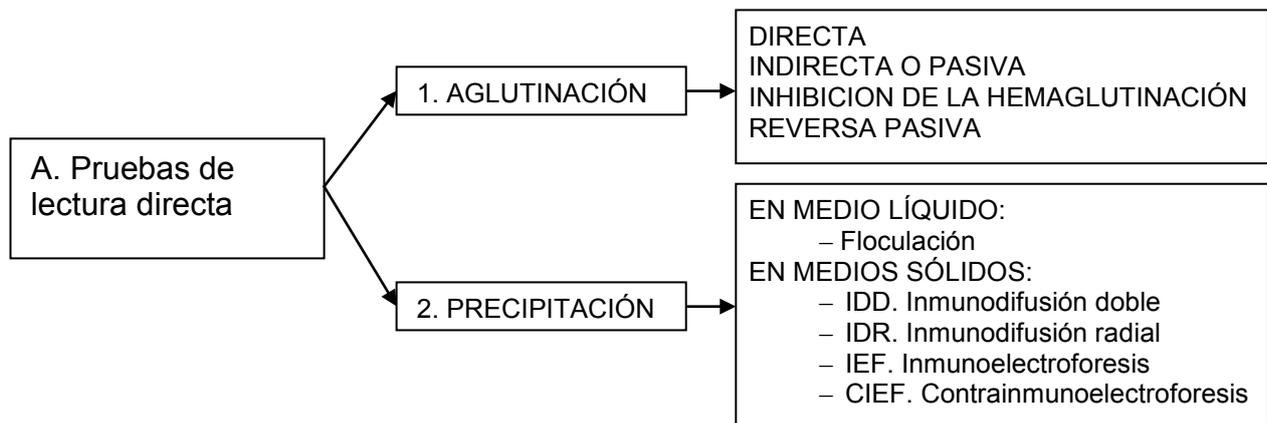
| PRUEBA                         | µg de Acs/ml* |
|--------------------------------|---------------|
| IDD (inmunodifusión doble)     | 18.7-62.5     |
| IDR (inmunodifusión radial)    | 18.7-62.5     |
| IEF (inmunolectroforesis)      | 18.7-125      |
| FC (fijación del complemento)  | 0.6           |
| IF (inmunofluorescencia)       | 0.6           |
| AD (aglutinación directa)      | 0.06-3.1      |
| AP (aglut. pasiva o indirecta) | 0.006-0.06    |
| ELISA (enzimoinmunoensayo)     | <0.006        |
| RIA (radioinmunoensayo)        | <0.006        |

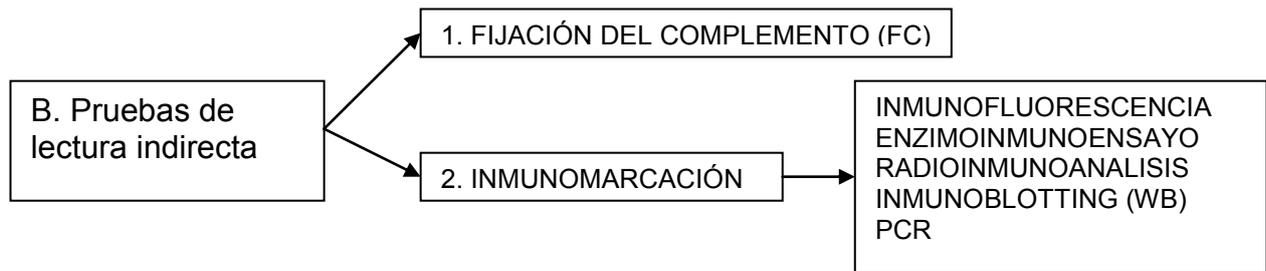
\*Concentraciones mínimas de Acs detectables)

### Clasificación de las pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se pueden dividir en dos grandes grupos.

- Pruebas de lectura directa:** son las pruebas que se basan en la interacción primaria y secundaria entre Acs y Ags, se leen por la aparición de un agregado o precipitado visible. Técnicas de floculación, precipitación y aglutinación.
- Pruebas de lectura indirecta:** se basan en la interacción primaria solamente, son de lectura indirecta, porque no se pueden observar a simple vista. Incluyen: fijación de Complemento (FC), Enzimoinmunoensayo (ELISA), Radioinmunoanálisis (RIA), Inmunoblotting (WB), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).





## A. Pruebas de lectura directa

### 1. Técnicas de Aglutinación

Las reacciones de aglutinación consisten en el agrupamiento de una suspensión de partículas que se debe a la reacción entre un antígeno presente en las partículas (aglutinógeno) y un anticuerpo específico de él (aglutinina).

Se basan en la aparición de una aglutinación visible a simple vista cuando se enfrentan antígenos particulados (bacterias, glóbulos rojos, células, partículas inertes) con sus anticuerpos específicos (solubles).

Las partículas pueden ser vitales o inertes. Como partículas vitales se emplean hematíes y bacterias. Las partículas inertes pueden ser de carbón vegetal, látex, bentonita, gelatina, etc. Si la partícula utilizada en la aglutinación es un hematíe, se dice que es una reacción de hemaglutinación.

*Ventajas:*

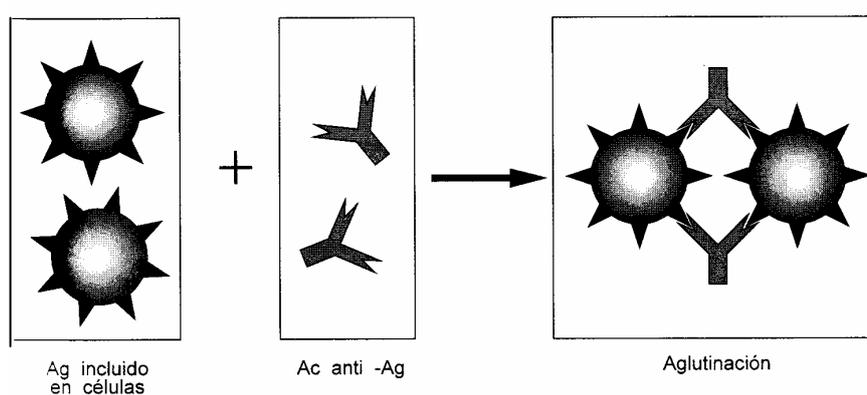
- Alto grado de sensibilidad.
- Se pueden detectar una gran cantidad de antígenos mediante estas pruebas.

*Desventajas:*

- Son meramente cualitativas.
- Son difíciles de cuantificar. Una forma de dar una idea aproximada de la cantidad de sustancia problema, consiste en asignar más o menos cruces (+ a +++) a la aglutinación.

### Aglutinación directa (AD)

Las pruebas de aglutinación directa son aquellas en las que la aglutinina reacciona con un aglutinógeno presente en una forma natural en la superficie de un tipo de células. Figura 19.2. En este caso el antígeno siempre es una partícula vital (bacteria o hematíe). Permite la detección de Ag o Ac. Puede ser cualitativa o cuantitativa.



**Figura 19.2** Aglutinación Directa.

La aglutinación directa cualitativa se realiza en medio líquido enfrentando Acs conocidos con un Ag desconocido (o viceversa), luego de unos minutos de agitación (favorece el fenómeno) se observa la aglutinación. Ejemplo: detección de grupos sanguíneos (hemaglutinación).

La aglutinación directa cuantitativa solo permite una estimación aproximada de los Acs de la muestra en estudio. Se realiza en medio líquido procediendo a la titulación del suero.

Ejemplo: detección de anticuerpos antisalmonellas para el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, detección de Acs antibrucelas en el diagnóstico serológico de brucelosis, detección de anticuerpos antitoxoplasma gondii.  
Pueden presentar problemas del fenómeno de prozona.

### Aglutinación indirecta (AI) o pasiva (AP)

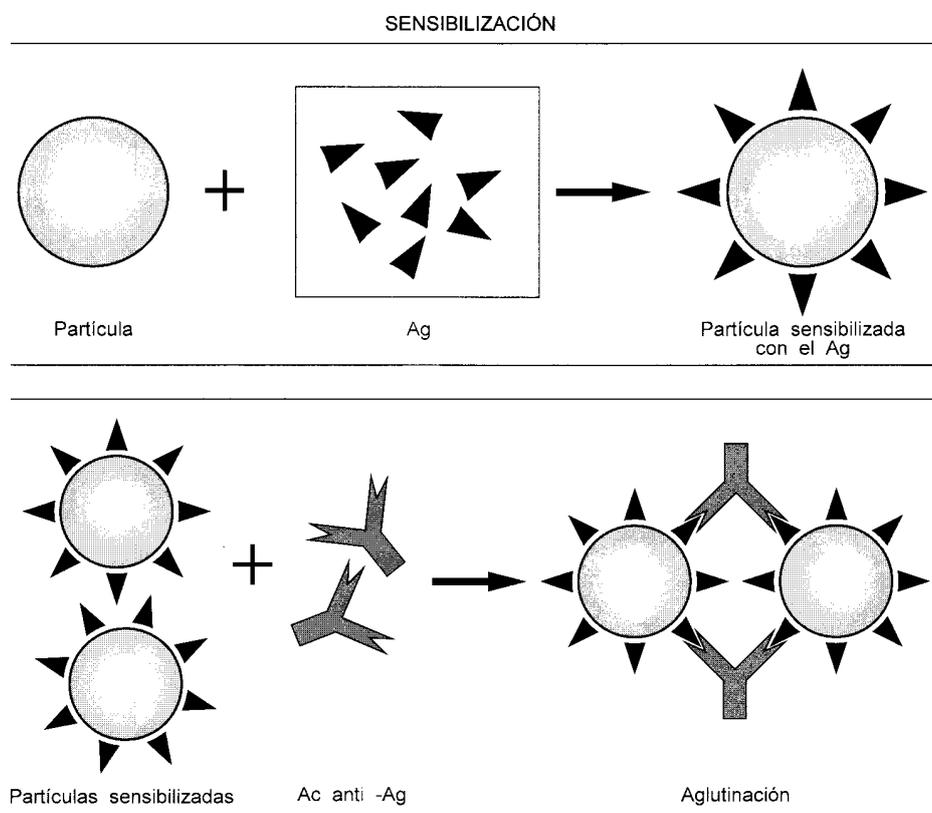
Las pruebas de aglutinación indirecta o pasiva son aquellas en las que la aglutinina reacciona con un aglutinógeno que ha sido transferido pasivamente a la superficie de una partícula vital o inerte, Figura 19.3. Esta técnica inmunológica se basa en que los Ags solubles pueden fijarse sobre partículas más grandes. Ejemplo: glóbulos rojos, partículas de látex, etc.

Muchos Ags se unen espontáneamente a los glóbulos rojos de distintas especies, otros Ags pueden ser adsorbidos a los glóbulos rojos mediante técnicas especiales (usando ácido tánico o glutaraldehído). Estos glóbulos rojos recubiertos o sensibilizados se utilizan en muchas técnicas de aglutinación pasiva para la detección de Acs contra hongos, bacterias, protozoos.

También los Ags pueden pegarse a partículas inertes de bentonita o de látex.

Ejemplo de estas técnicas: la detección del factor reumatoideo, proteína C reactiva, antígenos meningococcicos, anticuerpos anti *Tripanozoma cruzi*.

Esta técnica es más sensible que la aglutinación directa.



**Figura 19.3.** Aglutinación indirecta.

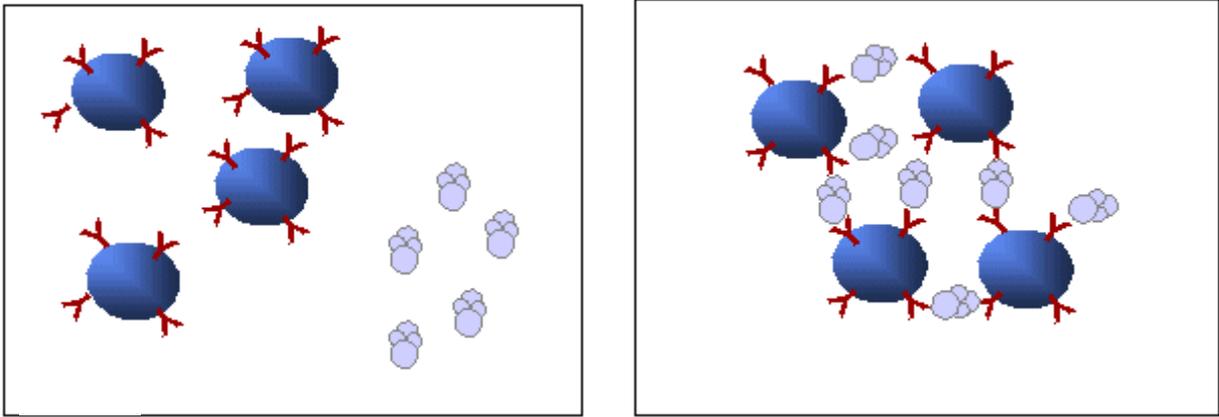
### Inhibición de la hemaglutinación

Existen virus que pueden aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies. Esta cualidad permite detectar Acs específicos contra ese virus en el suero del paciente, ya que este se unirá específicamente al virus y este perderá así su capacidad de aglutinar los glóbulos rojos, es decir se inhibe la hemaglutinación viral, lo que indica la presencia del anticuerpo respectivo. Ejemplo: en la detección de Acs anti rubéola, sarampión y otros.

### Aglutinación reversa pasiva (ARP)

Es una técnica similar a la AP que se utiliza para detectar Ags, por lo que los glóbulos rojos o las partículas inertes son sensibilizadas o pegadas con los Acs específicos, Figura 19.4.

Es una técnica altamente sensible. Ejemplo: detección del Ag de superficie del virus de la hepatitis B.



**Figura 19.4.** Aglutinación reversa pasiva.

## 2. Pruebas de precipitación

Las reacciones de inmunoprecipitación se producen cuando un Ag soluble interacciona con su Ac específico, formándose unos complejos Ag-Ac que se organizan entre sí, dando lugar a una especie de enrejado insoluble. Estas técnicas inmunológicas se basan en la aparición de un precipitado visible cuando se enfrentan Ags solubles con sus Acs específicos. Se fundamenta en la interacción primaria y secundaria.

Para que este tipo de reacción se produzca, tanto el Ag como el Ac han de ser multivalentes, es decir, mientras que el Ag debe poseer varios determinantes antigénicos (4 o 5), basta con que el Ac tenga, al menos, 2 sitios de combinación con el Ag.

A medida que los Ac van uniéndose a determinantes antigénicos de distintas moléculas de Ag, van formándose complejos inmunes cada vez más grandes, que acaban volviéndose insolubles y precipitando.

*Ventajas:*

- Alta especificidad.
- Pruebas cuantificables.
- Bajo costo.

*Desventajas:*

- Baja sensibilidad.
- Detectan solo Acs precipitantes.

Las pruebas de precipitación se pueden realizar en medio semisólido o en medio líquido y en ambos casos pueden ser cualitativas o cuantitativas.

### Precipitación en medio líquido

Las reacciones de inmunoprecipitación, realizadas en un medio líquido, que generan un gran precipitado cuyos componentes están unidos laxamente, reciben el nombre de "*Reacciones de floculación*".

La más conocida es la reacción de VDRL para la detección de Ac anti *Treponema pallidum*. En este caso el tamaño del Ag no es particulado, es de tamaño molecular, a nivel de micelas. Se forma un gel solvatado en el que las partículas se mantienen en grumos, en los casos positivos. Ejemplo: reacción de VDRL para la detección de Ac anti *Treponema pallidum*.

En la reacción de V.D.R.L (Venereal Disease Research Laboratory) para la detección de sífilis se trata de detectar la presencia de un Ac contra haptenos lipídicos de *Treponema pallidum* que a su vez se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y hasta en los propios tejidos del huésped.

### Precipitación en medios semisólidos

Las reacciones de inmunoprecipitación ejecutadas en un medio semisólido se conocen como reacciones de precipitación en geles o de inmunodifusión, debido a que los medios semisólidos más frecuentemente usados son el gel de agar y el de agarosa.

Los Ags y Acs pueden incorporarse a un medio gelificado por adición de agar purificado o agarosa. En estos medios las moléculas se mueven en todas direcciones a través de los

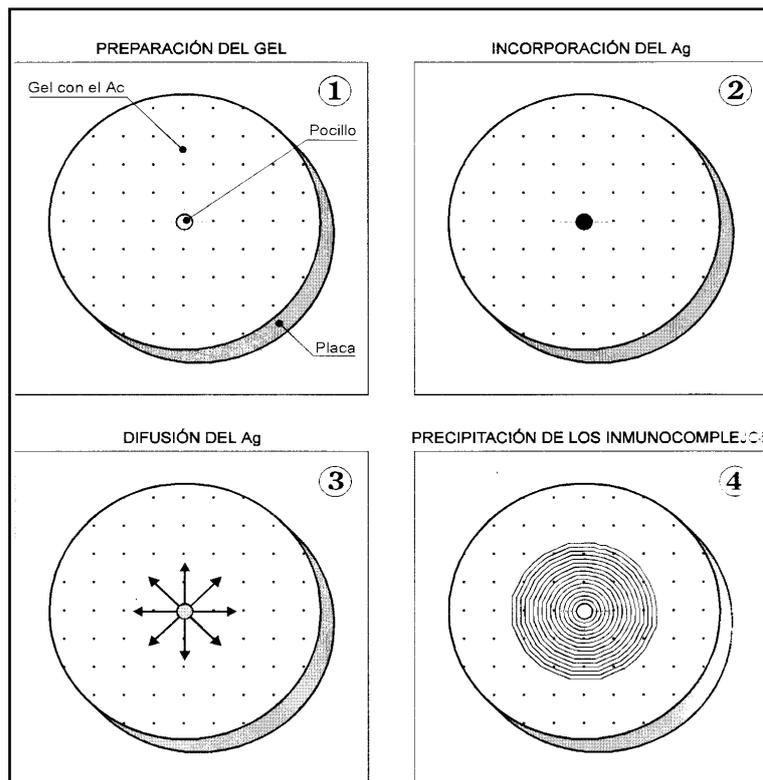
poros del gel. A medida que se alejan de su lugar de origen se genera un gradiente de concentración. En el lugar donde se encuentran los Ags y Acs a una concentración óptima (zona de equivalencia inmunológica) aparece una línea de precipitación blanquecina visible que corresponde a la interacción secundaria.

Hay distintas variantes de técnicas de precipitación en medios semisólidos:

- 1) Inmunodifusión radial (IDR)
- 2) Inmunodifusión doble (IDD)
- 3) Inmunoelectroforesis (IEF)
- 4) Contrainmunoelectroforesis (CIE)

### 1-Inmunodifusión radial (IDR)

Es una técnica iniciada por Manzini que consiste en la reacción de inmunoprecipitación verificada, en el interior de un medio semisólido, entre un Ag y su Ac correspondiente, obteniéndose, como resultado final, un ANILLO de precipitación, Figura 19.5.



**Figura 19.5.** Esquema de una Inmunodifusión radial.

En esta técnica se incorpora, por ejemplo, una solución determinada de Acs al gel fundido, que luego se deposita sobre una placa de Petri o un portaobjetos. Luego de su solidificación se realizan pequeños pocillos en donde se introduce la solución de Ags a investigar. Las moléculas de Ags difunden en todas direcciones a través del agar. Tras un período de incubación de 48 a 72 horas aparece una banda de precipitación circular alrededor del pocillo donde fue sembrado el Ag, Figura 19.5.

El diámetro del círculo de precipitación es proporcional a la cantidad de Ag sembrada. Por lo tanto es posible cuantificarla a partir de la siembra de concentraciones conocidas del Ag, se miden los diámetros de los círculos de precipitación y se comparan con el Ag en estudio.

Ejemplo de aplicación de esta técnica son la determinaciones de Inmunoglobulinas A, M y G; fracciones del complemento C3 y C4, fibrinógeno, etc.

### 2- Inmunodifusión doble (IDD) o método de Outcherlony

A diferencia de la IDR, donde el Ac está fijo al gel y la molécula que migra es el Ag en estudio, en la IDD ambas moléculas Acs y Ags difunden en todas direcciones.

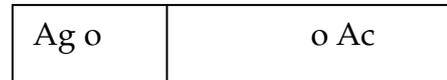
Consiste en sembrar en pocillos realizados sobre una superficie de agar solidificado separados a una distancia adecuada el Ac y el Ag. Luego de unas horas de incubación se

observarán una o varias bandas de precipitación entre los dos pocillos en la zona de equivalencia inmunológica.

- a) Zona de equivalencia:  
El Ag y el Ac reaccionan en forma equidistante.



- b) El Ag se halla en concentración reducida o no ha difundido con tanta rapidez debido a mayor tamaño molecular.



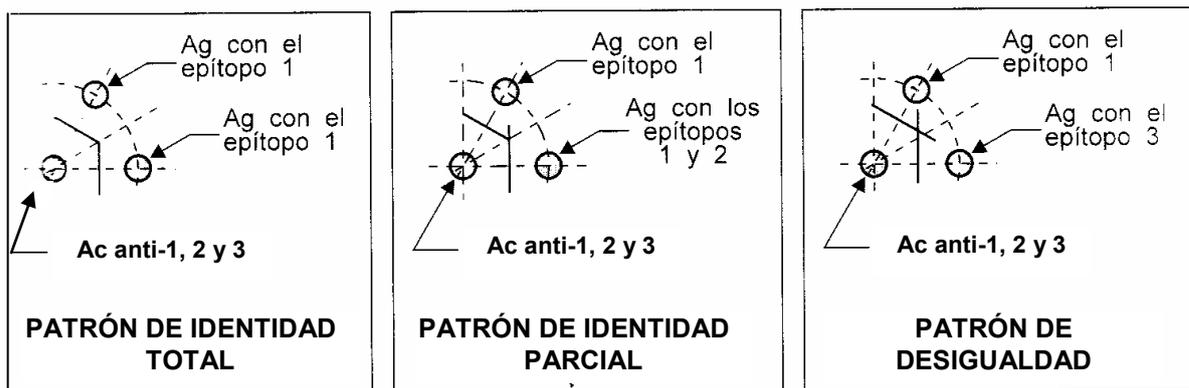
- c) Un contaminante o impureza presente en el Ag está reaccionando con el Ac.



Con esta técnica podemos obtener una idea de las relaciones entre los pesos moleculares de los Ags y Acs reaccionantes. También permite un estudio cualitativo de la homogeneidad entre el Ag y el Ac purificado, por lo que resulta útil para la búsqueda de impurezas.

Como se puede identificar varios sistemas reaccionantes, es posible investigar reacciones cruzadas.

Con esta técnica se puede estudiar cualitativamente los grados de similitud entre varios Ags enfrentados frente a un mismo Ac, produciéndose bandas de precipitación que indicarán si existe identidad total, parcial o no existe identidad entre los Ags en estudio comparados entre sí o comparados con un Ag conocido (Figura 19.6).



**Figura.19.6. INMUNO DIFUSIÓN DOBLE:** esquemas de reacciones de Ouchterlony. 1, 2 y 3, antígenos. Anticuerpos anti 1, 2 y 3. I, Patrón de identidad total. II, patrón de identidad parcial. III, patrón de desigualdad.

### 3- Inmunoelectroforesis (IEF)

La IEF es una técnica que se realiza cuando la mezcla antigénica es demasiado compleja, y los Ags han de separarse, antes de ser visualizados mediante precipitación. Esta técnica combina las propiedades de la electroforesis con la precipitación en medio sólido.

Aplicaciones de esta técnica se encuentran en el estudio de proteínas plasmáticas y en la identificación de inmunoglobulinas.

Se realiza en tres etapas, Figura 19.7:

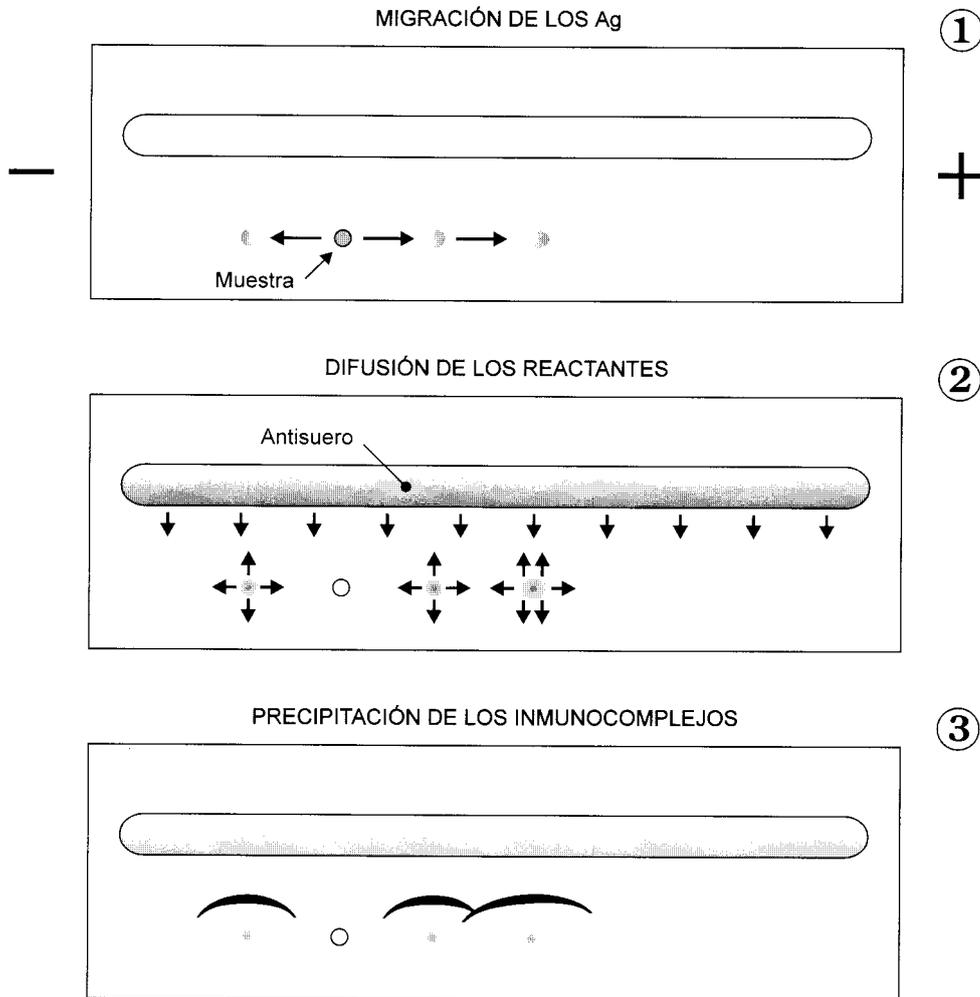
1) En la primera etapa se aplica una electroforesis a los Ags proteicos (ejemplo: suero humano) que se han sembrado en un pocillo realizado sobre una superficie de agar solidificado. Estas proteínas al ser sometidas a un campo eléctrico se separarán según su movilidad electroforética, esta dependerá de la carga eléctrica que posean las mismas según el pH, la fuerza iónica del medio en el que fueron sembradas y el agar.

Aquí se presenta el fenómeno de electroendósmosis que es un fenómeno secundario que acompaña a la electroforesis. Se debe a que el agar no es una sustancia absolutamente

neutra y el líquido que embebe al gel toma un movimiento de sentido contrario al de la corriente eléctrica.

2) En la segunda etapa se coloca en forma paralela a la línea de migración de las proteínas (Ags), un antisuero total. Por ejemplo: antisuero humano.

3) Luego de un período de incubación de 24 - 48 horas el antisuero habrá difundido a través del gel hasta encontrar a su Ag correspondiente; observándose tantos arcos de precipitación como Ags haya en la muestra, correspondientes a la zona de equivalencia inmunológica.



**Figura 19.7.** Fases de una inmunoelectroforesis.

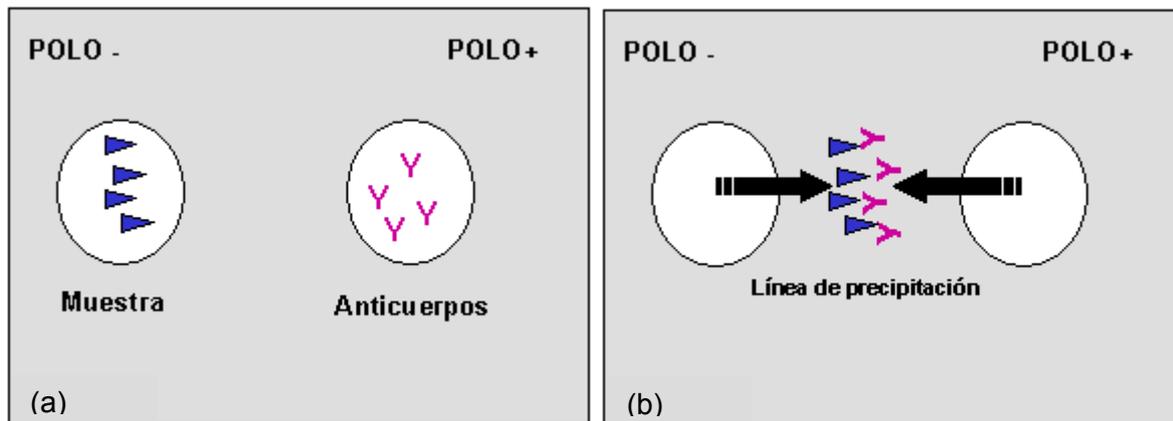
#### 4. Contrainmunolectroforesis (CIE)

Esta técnica utiliza una superficie de gel de agarosa con dos pocillos enfrentados a una distancia determinada, en uno de ellos se coloca el Ag y en el otro se coloca el Ac, Figura 19.8.(a). Luego se aplica una corriente eléctrica continua. El buffer que se utiliza deja al Ag cargado negativamente y al Ac en su punto isoeléctrico.

Al aplicar la corriente eléctrica el Ag migrará hacia el polo positivo y el Ac (carga neutra) será arrastrado por el movimiento del agua en el gel hacia el polo negativo por el fenómeno de electroendósmosis. Este flujo osmótico (o electroendosmosis) se debe a que en un gel de agar los residuos aniónicos (fundamentalmente sulfato y piruvato) se encuentran fijados covalentemente a la matriz del gel sin poder migrar dentro del campo magnético. En cambio, los cationes con las moléculas de agua asociadas sí son capaces de migrar catódicamente. Como consecuencia, se produce un movimiento neto de agua que puede arrastrar a las moléculas que, en las condiciones en que se practique la electroforesis, presenten carga neutra.

De esta manera ambos, Ag y Ac, se mueven uno hacia el otro y al encontrarse en la zona de equivalencia inmunológica se producirá una banda de precipitación, Figura 19.8.(b).

Esta técnica es muy rápida (45 minutos) y de mayor sensibilidad que las anteriores. Es ampliamente aplicada en el diagnóstico de hepatitis B y en enfermedades meningocócicas.



**Figura.19.8.** Contrainmunolectroforesis.

## B. Pruebas de lectura indirecta

Estas técnicas se basan en el fenómeno de formación de complejos inmunes. Esta es una interacción no visible, es la interacción primaria. Pero para demostrarla es necesario recurrir a la aplicación de distintas metodologías indirectas.

Dentro de estas describiremos a las técnicas de:

- Fijación del complemento (FC)
- Inmunomarcación: ELISA, IFD e IFI

### Fijación del complemento

Esta técnica se basa en que los complejos inmunes formados reaccionan con el complemento fijándolo e inhibiendo así la hemólisis que este último produciría sobre un sistema indicador constituido por un complejo Ag-Ac (Glóbulos rojos de carnero—suero hemolítico antiglobulinos rojos de carnero); este sistema indicador también se llama sistema hemolítico.

Con esta técnica se pueden determinar Acs o Ags, según el interés que cada uno necesite.

Esta técnica se desarrolla en dos etapas:

a) En la primera se inactiva el suero en estudio calentándolo a 56°C durante 30 min., para eliminar el complemento propio del suero y sustancias anticomplementarias, para que no interfieran en la prueba. Luego se lo enfrenta al Ag específico conocido, si lo que se busca son Acs, se añade a continuación el complemento rigurosamente titulado con anterioridad.

En este paso si existen Acs en el suero de estudio se produce la interacción primaria, con la consiguiente formación de complejos inmunes, que fijarán todo el complemento disponible agregado. Si no existen Acs, no se formará este complejo y por lo tanto el complemento quedará libre y disponible.

b) La segunda etapa consiste en agregar el sistema indicador Glóbulos rojos de carnero-Acs hemolíticos, que pondrá en evidencia la utilización o no del complemento de la primera etapa.

Si fue utilizado, me indica presencia de Acs específicos y el sistema indicador estará libre y formará un agregado de glóbulos rojos con forma de un botón en el fondo del tubo o placa. Si el complemento no fue utilizado en la primera etapa, significa que no hay Acs específicos, y este complemento estará libre para fijarse al sistema indicador produciendo hemólisis de los glóbulos rojos por la actividad lítica del complemento en su interacción con el inmunocomplejo del sistema indicador.

La interpretación de la prueba de fijación del complemento será:

- (+) Ausencia de hemólisis = resultado positivo = presencia de Acs específicos.
- (-) Presencia de hemólisis = resultado negativo = ausencia de Acs específicos.

Esta prueba es de alta sensibilidad y especificidad. Se puede utilizar tanto para Ags particulados como para Ags solubles. Se utiliza tanto en el diagnóstico de infecciones virales, micosis profundas, por clamidias, protozoos sanguíneos, etc.

### Pruebas de inmunomarcación

Son técnicas que utilizan otros sistemas indicadores de la interacción primaria o unión Ag-Ac. Son pruebas altamente sensibles. Son más complejas y de mayor costo. Estas son:

1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)
2. Inmunofluorescencia (IF)
3. Técnicas de "Blotting"
4. Radioinmunoanálisis (RIA)

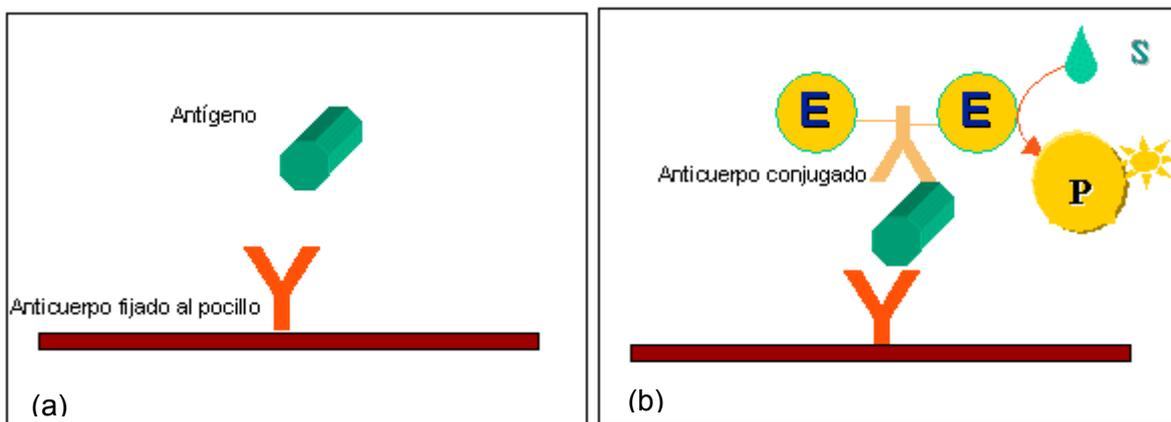
#### 1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Las técnicas ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), EIA (Enzimo Inmuno Análisis), EIE (Enzimo Inmuno Ensayo), se basan en dos *fenómenos biológicos* importantes:

- 1) La elevada especificidad de los Ac (generalmente monoclonales).
- 2) La alta actividad enzimática, lo cual permite amplificar la señal generada a partir de la interacción Ag-Ac.

Los principios de esta técnica comprenden *dos etapas generales*:

- a) La interacción específica del inmunorreactante con su Ag o Ac, Figura 19.9.(a).
- b) Se utiliza un sistema conjugado enzimático con su sustrato/cromógeno para la detección de ese inmunorreactante, Figura 19.9.(b).



**Figura 19.9.** Enzimoimmunoensayo.

Ventajas:

- Alta sensibilidad
- Sencillez
- No requiere de equipamiento sofisticado.
- Vida media de los reactivos muy larga.
- No se corre riesgo de contaminación ambiental (caso RIA).
- La técnica de ELISA se usa tanto para la detección de Acs como para la detección de Ags.

Los soportes en los que se desarrollará la técnica pueden ser variados: tubos, esferas, discos o concavidades de placas de poliestireno o polipropileno. Se aprovecha la capacidad que tienen las proteínas de adsorberse a pH 9 - 10 a estos soportes.

En general en todo ELISA se distingue tres etapas:

- 1) Inmovilización del inmunorreactante (Ac o Ag) en la fase sólida.
- 2) Incubación con la muestra para realizar la interacción inmunológica.
- 3) Amplificación o modulación por medio de la utilización de un conjugado enzimático (la cual puede darse en más de un paso).

Se puede asimilar esta técnica a la de Inmunofluorescencia. La diferencia reside en la marcación de los Acs. En el ELISA la marcación se produce con una enzima, Tabla 19.2, mientras que en la IF con un fluorocromo.

**Tabla 19.2.** Enzimas utilizadas para ELISA.

| ENZIMA             | SUSTRATO   | CROMÓGENO                            | VENTAJA                               | DESVENTAJA                  |
|--------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Peroxidasa         | Agua oxigenada   | Ortofenilendiamina (OPD)             | Alta detectabilidad                   | Carcinogénica, fotosensible |
| Peroxidasa         | 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH)                          | Ácido 3-dimetilamino benzoico (DMAB) | Alta detectabilidad, no carcinogénico | Altos valores basales       |
| Peroxidasa         | 2,2"azino-di-(3 etil-benzotiazolina-6-sulfonato de diamonio (ABTS) |                                      |                                       |                             |
| Fosfatasa alcalina | Paranitrofenil fosfato (p-NNP)                                     |                                      | Bajo nivel de hidrólisis espontánea   |                             |

Tienen dos variantes:

- a) ELISA no competitivo
- b) ELISA competitivo

**a) ELISA no competitivo**

1) *Fijación del antígeno*

El Ag en solución salina se incuba en un tubo o placa de poliestireno, Figura 19.10. La superficie del plástico absorberá pequeñas cantidades de Ag, eliminándose el sobrenadante por lavados, luego se bloquean con una proteína no específica los pequeños espacios entre los Ags absorbidos, que pueden servir para retener Ac en forma mecánica (no específica). Así realizado el Ag queda unido a su soporte.

2) *Agregado del Ac específico (muestra del paciente)*

Se añade la muestra del paciente (que contiene el Ac específico contra ese Ag), se produce la reacción Ag-Ac, el exceso de Acs no unidos se eliminan por lavados.

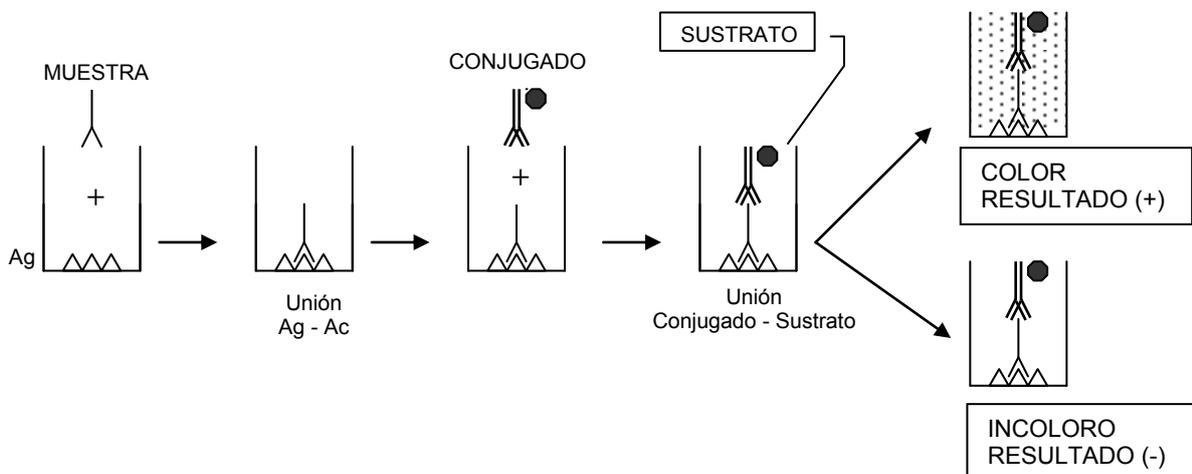
3) *Proteínas ligando conjugada*

El Ac específico se detecta mediante un conjugado anti gammaglobulina marcada con una enzima. Las enzimas frecuentemente utilizadas unidas al ligando son la peroxidasa o la fosfatasa alcalina.

4) *Sustrato*

Para visualizar la unión del ligando a su Ac y de este al Ag, se agrega un sustrato capaz de reaccionar con la enzima utilizada. Este sustrato es un cromógeno (es decir una sustancia incolora capaz de colorearse por cambios moleculares producidos por la enzima).

La cantidad de Ac se determina evaluando la intensidad de la densidad óptica el producto final mediante un lector de ELISA o un espectrofotómetro.



**Figura 19.10.** ELISA no competitivo.

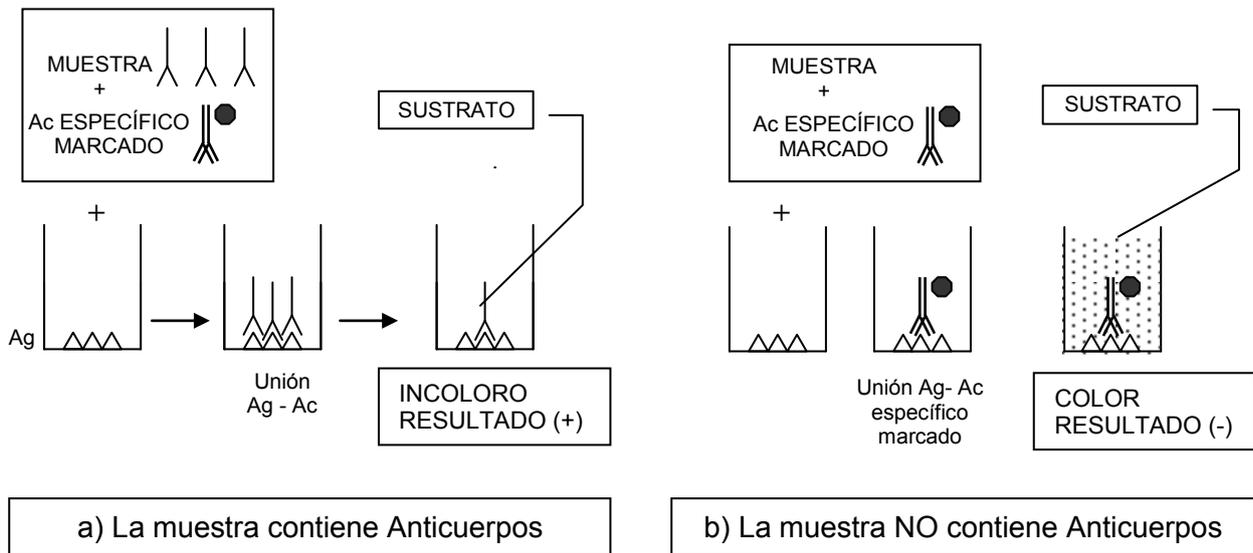
## b) ELISA competitivo

Consiste en hacer reaccionar frente a un Ag, los Acs específicos (uno de la muestra y otro marcado con la enzima), los que competirán por los mismos sitios antigénicos.

A medida que la cantidad de Ac presentes en la muestra sea mayor la unión de estos al Ag desplazará a la del anticuerpo marcado, el que finalmente se eliminará por lavados.

La resultante será una disminución de la densidad óptica de la reacción.

En la Figura 19.11 (a) la muestra contiene Acs específicos, resultado positivo → incoloro, y en la Figura 19.11 (b) la muestra no contiene los Acs, resultado negativo → coloreado.



**Figura 19.11. ELISA competitivo.**

## 2. Inmunofluorescencia

### a) Inmunofluorescencia directa (IFD)

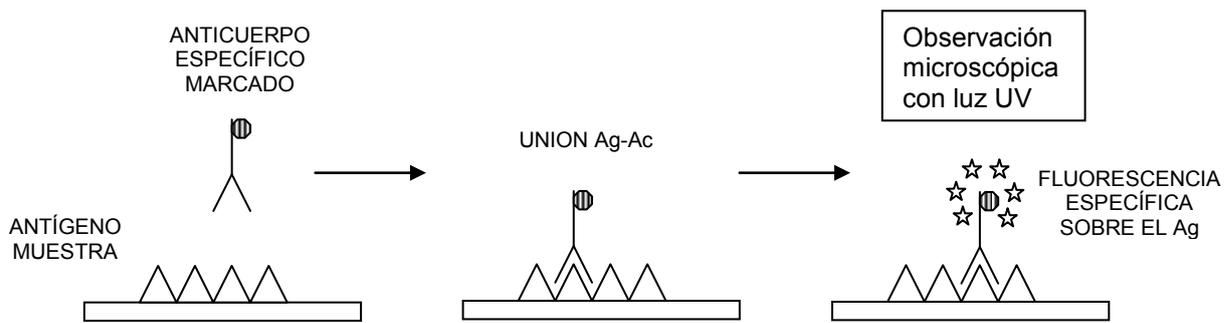
Se basa en la marcación de Acs específicos con una sustancia fluorescente que puede ser la Rodamina o el Isotiocianato de fluoresceína que, al reaccionar específicamente con el Ag en estudio, produce la interacción primaria, la que es puesta de manifiesto a través de la observación con el microscopio de fluorescencia (Figura 19.12).

El procedimiento tiene varios pasos.

1. Se comienza con la preparación de la muestra, la cual puede ser tejido, moco respiratorio o vaginal, tejido de necropsia, etc., que se depositan sobre un portaobjeto constituyendo las improntas.
2. Se realiza la fijación al vidrio.
3. Luego se realiza la tinción con el Ac específico marcado con la sustancia fluorescente, con un tiempo de incubación variable.
4. Se elimina, con lavados, el exceso de Acs marcados que no se han unido.
5. Se adiciona el líquido de montaje el cual posee un índice de refracción adecuado para la observación microscópica. Se protege con un cubreobjetos (montaje) y se observa al microscopio de fluorescencia las imágenes fluorescentes características según el Ag en estudio.

La inmunofluorescencia directa se usa para la detección de Ag y tiene la desventaja de la fluorescencia inespecífica que puede tener la muestra, lo que obliga a tener un observador experimentado y mucha prudencia en la interpretación de los resultados.

Ejemplo de su uso: detección de bacterias patógenas en materia fecal, clamidias en moco cervical, virus de la rabia en el cerebro de un animal presuntamente infectado, Ag del virus sarampión en el moco respiratorio, Ag del virus dengue en el cerebro de un mosquito infectado.



**Figura 19.12. IFD – Inmunofluorescencia directa.**

**b) Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Sirve tanto para la detección de Ag como para la detección de Acs. Cuando se buscan antígenos se deben contar con una amplia cantidad de anticuerpos frente a todos los antígenos lo que encarece la prueba. Por esto, se emplea con mayor frecuencia para la búsqueda de Acs en suero u otros líquidos en estudio. Describiremos ambos casos.

**Detección del Ag:** se sigue un procedimiento similar al la IFD, con un paso más.

La fase de preparación de la muestra es similar a lo ya mencionado, se depositan sobre un portaobjeto (improntas). Se fija al vidrio.

Posteriormente la reacción con el Ac específico, durante un tiempo de incubación variable para la formación del complejo Ag-Ac.

Se lava con soluciones buffer para eliminar el exceso de Ac que no se han unido al Ag.

A continuación se hace reaccionar con la antigamma globulina específica de especie marcada con la sustancia fluorescente, se incuba un tiempo variable, luego se lava, se realiza el montaje y la observación al microscopio de fluorescencia. Se observan imágenes fluorescentes características según el Ag en estudio.

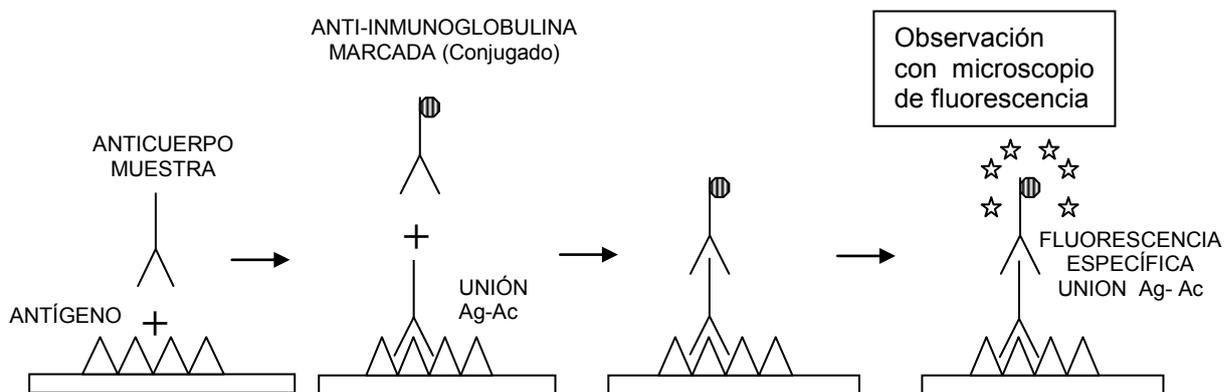
*Interpretación del resultado de la técnica:* será positiva en el caso de observar imágenes fluorescentes características. Será negativa si hay ausencia de fluorescencia característica.

**Detección de Acs:** el proceso es similar al descrito anteriormente con la diferencia que el Ag es conocido, generalmente son cultivos celulares infectados con virus, clamidias, parásitos o bacterias (Figura 19.13).

Se hace reaccionar con el suero o líquido en estudio, para detectar la presencia de Acs específicos; si están presentes se producirá la unión Ag-Ac, lo que demanda un tiempo de incubación variable. Se lava con soluciones buffer para eliminar el exceso de Acs que no se han unido al Ag.

Paso siguiente: se hace reaccionar con la antigamma globulina específica de especie marcada con la sustancia fluorescente, se incuba, luego se lava, se realiza el montaje y se observa al microscopio de fluorescencia. La observación al microscopio mostrará imágenes fluorescentes características según el Ag en estudio.

*Interpretación de la técnica:* será positiva en el caso de observar imágenes fluorescentes características. Será negativa si hay ausencia de fluorescencia característica.



**Figura 19.13. IFI – Inmunofluorescencia indirecta (detección de Acs).**

### **3. Técnicas de Blotting**

Estas técnicas aprovechan la capacidad de transferir una sustancia desde un gel, en la que por electroforesis se han separado sus componentes a un soporte más manejable como la nitrocelulosa. Se transfieren así una serie de bandas (blots).

En las reacciones de inmunoblotting los antígenos transferidos se estudian con anticuerpos marcados con radioisótopos (RIA) o enzimas (ELISA).

Existen variantes de las técnicas del inmunoblotting con distintas denominaciones según a que Ag se refieran o Ag que se pretende determinar:

- Proteínas Western blotting o Western blot
- RNANorthern blotting o Northern blot
- DNASouthern blotting o Southern blot

## Desarrollo Práctico N° 19

### Consignas

Cada grupo de trabajo realizará las siguientes técnicas inmunológicas:

1. VDRL. Cualitativa y cuantitativa.
2. Determinación de Grupos sanguíneos.
3. IDD.
4. ELISA.

### Materiales necesarios

#### Reacción de VDRL

- Antígeno de VDRL
- Policubetas de Kline
- Microscopio
- Micropipeta de 50  $\mu$ l

#### Determinación de Grupos sanguíneos

- Sueros anti A y anti B
- Placas de vidrio
- Pipetas Pasteur
- Varillas de vidrio

#### Inmunodifusión directa (IDD)

- Placa de Petri de plástico de unos 50 mm de diámetro.
- Plantilla de papel con 7 círculos dibujados, de forma que haya 1 central y los otros 6 estén dispuestos, en forma hexagonal, alrededor de él. El diámetro del círculo debe ser de 3 mm y la distancia entre los círculos de 10 mm.
- Perforador del gel.
- Gel de agarosa al 1%.

### Actividades

#### 1. Reacción de VDRL

La purificación de dos sustancias reactivas a partir del músculo de corazón de buey: cardioplipina y lecitina, condujeron al Ag más específico usado en la actualidad en la prueba de VDRL. Además se incorpora colesterol, el que proporciona los centros de absorción de tal forma que las partículas interactuantes específicas pueden visualizarse. Esta reacción detecta reaginas (Acs) que son características de la sífilis, pero no específicas. En diversos casos pueden existir personas sanas, o que cursen alguna otra enfermedad sin síntomas clínicos evidentes de sífilis, que den pruebas reactivas; a estos casos se los denomina "falsos reactivos biológicos". Ejemplo: mujeres embarazadas, pacientes con hepatitis, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas agudas. En estos casos se recomienda confirmar con una prueba específica como la FTA.

#### Prueba de VDRL cualitativo (Prueba rápida de floculación en placa para suero o plasma)

*Técnica:* colocar 50  $\mu$ l de cada una de las muestras de suero o plasma sin diluir en un pocillo de la placa y distribuirla en toda la superficie del círculo. Agitar la suspensión antigénica para homogeneizar y colocar una gota sobre cada muestra usando la pipeta que trae el equipo. Homogeneizar 4 minutos. Leer inmediatamente en un microscopio usando aumento de 10X.

*Interpretación de resultados:* los resultados de la prueba sobre portaobjetos se califican de:

- No reactivas (no hay floculación).
- Débilmente reactivas (ligera floculación).
- Reactiva (floculación definitiva, definida, nítida).

**Prueba de VDRL Cuantitativa:** todos los sueros reactivos deben diluirse en forma seriada al 1/2, 1/4 y así sucesivamente.

## 2. Determinación de Grupos sanguíneos

### Sistema AB0 - Fundamentos

Los Ags eritrocitarios A y B son polisacáridos constituyentes de la membrana de los GR de los individuos que poseen los genes A y B, respectivamente. Ac anti A y anti B se hallan en el suero de personas cuyos hematíes no tienen el Ag correspondiente. Estos Acs se unen a los hematíes que poseen el correspondiente determinante antigénico produciendo una aglutinación directa.

Las reacciones con sueros anti A o anti B o con ambos determinan e identifican los grupos sanguíneos A, B o AB respectivamente. La ausencia de aglutinación con anti A, anti B determinan el grupo 0.

### Prueba en placa de vidrio (portaobjetos)

Colocar dos gotas de sangre entera (sin coagular) o suspensión de GR al 35-45% en una placa de vidrio. Agregar una gota de suero de grupo sanguíneo específico (anti A, anti B) sobre cada una de las gotas de sangre. Mezclar con una varilla de vidrio. Efectuar movimientos rotatorios lentos de la placa. Examinar la presencia de aglutinación durante un tiempo que no exceda los dos minutos.

Todos los resultados de las muestras de los GR probados deben ser confirmados con la prueba indirecta o inversa, usando suero del paciente y células conocidas del grupo A y B.

*Interpretación de los Resultados:*

| Anti A | Anti B | Grupo Sanguíneo | Frecuencia % |
|--------|--------|-----------------|--------------|
| -      | -      | 0               | 45           |
| +      | -      | A               | 40           |
| -      | +      | B               | 1            |
| +      | +      | AB              | 4            |

## 3. Inmunodifusión directa (IDD)

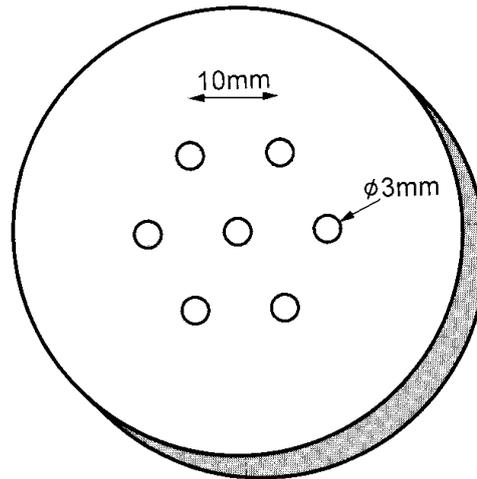
La IDD es una prueba descrita por Ouchterlony que consiste en lo siguiente:

- Se vierte gel de agar o de agarosa (a unos 60°C) en un recipiente, que puede ser un portaobjetos o una placa de Petri, hasta que alcance 1,5 mm de altura aproximadamente.
- Dejar que se enfríe para que solidifique.
- Situar la plantilla debajo de la placa de Petri, para que se vean los círculos dibujados en ella, a través del gel de agarosa (Figura 19.14).
- Con la plantilla como guía y mediante el perforador, taladrar el gel de agarosa en las zonas que coinciden con los círculos de la misma. Retirar los trozos de agar para formar los pocillos.
- Numerar los pocillos en la parte inferior de la placa de agarosa.
- Llenar el pocillo central de la placa de agarosa con 10 µl de antisuero anti IgG, y los pocillos periféricos con 10 µl de cada una de las diluciones de suero preparadas previamente.
- Tapar la placa.
- Incubar la placa 48 horas a 37 °C o 72 horas a temperatura ambiente.

Ambos reactivos difunden a través del gel, de forma radial, hasta alcanzar su punto de equivalencia y precipitar en la zona de aquél comprendida entre el pocillo del Ac y los del Ag.

## 4. ELISA

Seguir el protocolo provisto por el laboratorio para la prueba a realizar.



**Figura 19.14.** Plantilla para la inmunodifusión doble bidimensional.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- F. Rubio Campal, B.; García Espinosa, M.; Carrasco Carrasco. Inmunología. Aplicaciones prácticas en Hematología y Microbiología. Editorial Parainfo. 1995.
- J. A. Basualdo; C. E. Coto; R. A. de Torres. Microbiología Biomédica. Editorial Atlante. 1996
- Margni. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Editorial Panamericana, 5° edición.
- Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Año 2003.
- Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Año 2005.

## Trabajo Práctico N° 20

### VIROLOGÍA

#### Objetivos

- *Conocer diferentes métodos para el estudio de los virus.*
- *Reconocer las características morfológicas de un cultivo celular.*
- *Realizar un subcultivo celular.*

#### Introducción

Los virus son agentes infecciosos responsables de numerosas enfermedades del hombre, de los animales y plantas y pueden también afectar a las bacterias (bacteriófagos).

Los virus pueden definirse como agentes infecciosos caracterizados por:

- Ser parásitos intracelulares obligados.
- Su pequeño tamaño, 20 a 250 nanómetros (nm).
- Poseer una estructura elemental y un mecanismo especial de replicación.

Dado que los virus carecen de los constituyentes fundamentales para su crecimiento y multiplicación, tales como los que poseen las células procarióticas o eucarióticas (sistemas enzimáticos productores de energía, o necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, ribosomas, etc.) deben necesariamente utilizar los sistemas de la célula que parasita y por ello **son parásitos intracelulares obligados**.

La mayoría de los virus poseen un tamaño muy inferior al de las bacterias. Por ello, solo pueden observarse con el microscopio electrónico. Los virus más pequeños miden alrededor de 27 nm y los más grandes 250 nm ( $1\text{nm} = 10^{-3}\mu$ ).

#### Efecto de agentes químicos sobre los virus

En general, los virus son más sensibles que las bacterias o los hongos a la acción de los agentes fisicoquímicos. El conocimiento de la sensibilidad de los virus a las condiciones ambientales es importante para determinar la viabilidad de muestras clínicas para diagnóstico virológico, como así también para poder lograr una inactivación adecuada de aquellos materiales contaminados que necesitan desinfección.

La esterilización por calor seco en estufa o por calor húmedo en autoclave destruye a todos los virus, incluyendo a los resistentes como el de hepatitis B. Por esta razón, la esterilización en estufa o autoclave es el procedimiento de elección. En caso de materiales que no resistan el calor se utiliza el óxido de etileno o la radiación ionizante.

#### Obtención de muestras para estudio virológico

Desde el punto de vista epidemiológico, los virus pueden transmitirse por vía respiratoria, digestiva, cutáneomucosa o ingresar directamente a la sangre a través de picaduras de artrópodos (arbovirus) o bien transfusiones o materiales contaminados con sangre (virus de hepatitis B, C, Delta, virus HIV y HTLV).

La elección de las muestras depende de la naturaleza, de los síntomas del paciente y del conocimiento de la patogénesis del agente viral sospechado.

Como regla general, cuando una enfermedad genera lesiones sobre mucosas o epitelios, se toma material de dichas lesiones por medios de hisopos. Si la enfermedad se localiza sobre el tracto respiratorio se recomienda secreciones respiratorias o aspirados nasofaríngeos. Si es generalizada es recomendable tomar muestras de múltiples sitios.

#### Recolección y transporte

Es sumamente importante conocer antes de tomar la muestra, cuáles son las determinaciones que se realizarán y cuál es la forma más adecuada de preservación de la misma.

Para la mayoría de los virus, las muestras deben obtenerse dentro de la primera semana de iniciado el cuadro clínico.

La temperatura ambiente destruye muchos virus aunque el tiempo requerido para la inactivación depende de las características de la familia. Es necesario que las muestras

sean recolectadas bajo condiciones que permitan retener su contenido viral. Para tal fin, se usan medios de transporte diseñados para mantener la viabilidad. Los hisopos secos **no mantienen la infectividad viral** por lo que no son aptos para el intento de aislamiento.

Las muestras clínicas para aislamiento deben ser enviadas lo antes posible al laboratorio. De lo contrario, se pueden conservar por 1 o 2 días a 4-8°C en heladera. Es preferible mantener las muestras en un medio de transporte hasta 5 días a 4°C en vez de congelar.

De lo expuesto se desprenden las dos condiciones básicas a tener en cuenta; impedir la desecación de la muestra y mantenerla refrigerada.

Los sueros para la determinación de anticuerpos, deben ser conservados en heladera preferentemente en condiciones de esterilidad. Si se van a guardar más de una semana conviene congelarlos a - 20°C.

### **Métodos de estudio de los virus**

Los virus pueden estudiarse por métodos fisicoquímicos o bien por medio de procedimientos que demuestren su interacción con las células vivas, es decir su capacidad infecciosa.

Los métodos fisicoquímicos pueden detectar a los virus como partículas virales por microscopía electrónica, como unidades hemoaglutinantes por hemoaglutinación; como antígeno mediante técnicas inmunoquímicas, o como ácidos nucleicos mediante hibridación molecular o diversas técnicas de P.C.R. (reacción en cadena de la polimerasa).

Los estudios de infectividad son fundamentales para determinar la presencia del agente infeccioso viable en muestras clínicas provenientes del paciente. Un requisito esencial es lograr la replicación y propagación del virus en células vivas, ya sea en animales de experimentación, huevos embrionados o cultivo de células "in vitro", dado que los virus no pueden cultivarse en medios acelulares.

### **Métodos de estudio de los virus**

---

#### **Métodos directos**

- 1) Detección de infectividad: - Aislamiento del virus en cultivos celulares, huevos embrionados o animales de experimentación y posterior identificación del virus aislado por inmunomarcación u otras técnicas.
- 2) Detección de: - Partículas virales: Microscopía electrónica.
  - Antígenos virales: Métodos de inmunomarcación: Inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, ELISA.
  - Ácidos nucleicos; hibridación directa, PCR (diversas técnicas), carga viral (diversas técnicas).
  - Enzimas virales: Transcriptasa reversa.

#### **Métodos indirectos**

- 1) Detección de anticuerpos: - Conversión serológica en dos muestras pareadas de suero.
    - IgM específica (en una sola muestra de período agudo).
- 

### **Métodos directos de estudio de los virus**

#### **1. Aislamiento viral**

- Aislamiento en animales de experimentación
- Aislamiento en huevos embrionados
- Aislamiento en cultivos celulares: constituye el método de elección para el aislamiento de la mayoría de los virus.

El cultivo de tejidos animales se inició a comienzos de este siglo (Harrison, 1907, Carrel, 1912) y como su nombre lo indica se basaba en la utilización de fragmentos de tejidos sin disgregar, por lo cual el crecimiento estaba limitado a la periferia de tales fragmentos. A

partir de los años 50 esta metodología fue desplazada por una explosión en la expansión de los cultivos que utilizan células dispersadas, no obstante lo cual el término “**cultivo de tejidos**” sigue utilizándose como el nombre genérico para todas estas técnicas.

Fue necesario el descubrimiento previo de los antibióticos, imprescindibles para evitar la contaminación bacteriana de los cultivos.

Para realizar cultivos celulares se mantienen las células vivas en botellas o tubos o policubetas en condiciones de esterilidad, con medios nutritivos enriquecidos con sueros y antibióticos a 37°C.

### **Tipos de cultivo celulares**

Existen diversos tipos de cultivos celulares: los **cultivos primarios** y las **líneas celulares**. Cultivo primario es el primer cultivo *in vitro* de células tomadas directamente del organismo, mientras que línea celular es un subcultivo del cultivo primario.

Los **cultivos primarios** conservan el número diploide característico del organismo que le dio origen. Con los sucesivos pasajes se van acumulando alteraciones (mutaciones genéticas) dando un amplio espectro de variaciones celulares tanto genéticas como morfológicas. Cualquier cambio que involucre al complemento cromosómico completo (poliploidía) o a cromosomas individuales (aneuploidía) se denomina heteroploidía. Comparando el cariotipo primario con el de la línea celular continua, se puede observar que esta última presenta en general un alto grado de aneuploidía,

Los cultivos primarios son aquellos obtenidos directamente de órganos o tejidos: son diploides e iguales morfológicamente a las células que le dieron origen conteniendo usualmente una variedad de tipos celulares distintos que reflejan la estructura celular del órgano que le dio origen.

**Cepa** es aquel cultivo derivado de uno primario que por sucesivos pasajes permite la selección de un único tipo celular, mantiene la diploidía inicial y presenta alteraciones a nivel genómico que no pueden observarse en el cariotipo sino fisiológicamente.

La **línea celular** derivada de la cepa es heteroploide y presenta una morfología particular, ya sea de tipo epitelial o tipo fibroblástica, según el tejido que le dio origen. Sin embargo, su número de cromosomas es variable. Es decir pueden tener un número mayor o menor de cromosomas que el número normal de la especie que los originó.

Actualmente se considera que el cultivo recién establecido se denomina **primario**, que es de vida corta y generalmente se pierde en los primeros pasajes. Si el cultivo logra establecerse da origen a una **línea celular continua**, todavía diploide, que puede mantenerse por un número limitado de pasajes (alrededor de 50). Superada esta etapa, se logra una **línea celular continua establecida**, que pierde la diploidía inicial y teóricamente puede mantenerse indefinidamente.

### **Medios de cultivo**

Los medios pueden ser puramente biológicos (extractos embrionarios), semisintéticos (medios sintéticos más suero o albúmina), o absolutamente sintéticos.

Los factores que deben considerarse en la preparación de un medio son:

**1- Presión osmótica:** la presión normal para células de mamífero es 7,6 atm.; en general no afecta a las células una variación del 10%. La mayor contribución es del ClNa, también es importante controlar la glucosa y los iones. Las proteínas tienen poco efecto y su concentración puede tener grandes variaciones.

**2-pH:** el óptimo es 7,2-7,8, aunque muchas células toleran un rango de 6,8-7,8 (las linfoides son muy sensibles a la alcalinidad). El medio debe contener un buffer para mantener el pH adecuado.

Buffers: Bicarbonato/CO<sub>2</sub>: el más usado, aunque su capacidad buffer está por debajo del pH óptimo.

Hepes: no se encontró toxicidad para ningún tipo de células, su capacidad buffer está en el rango óptimo.

Otros: Tris, glicil-glicina, bases libres de aminoácidos.

Se utiliza como indicador el rojo fenol que tiene color amarillo a pH ácido y vira al rojo y al púrpura cuando aumenta la alcalinidad.

**3-Fuente de energía:** está dada por la glucosa, también se utilizan otros azúcares o compuestos simples, piruvato o lactato.

**4-Iones Inorgánicos:** intervienen en diversos procesos:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{=}$ . Regulación de la presión osmótica ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ).

Regulación del pH ( $\text{CO}_3^{=}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

Actividades metabólicas y enzimáticas ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

Adhesión y esparcimiento de las células en el recipiente ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ).

**5-Gases:** oxígeno, dióxido de carbono.

**6-Temperatura:** cada cultivo celular tiene un rango de temperatura óptimo para su desarrollo. Generalmente las células de animales de sangre caliente se cultivan a 37°C.

**7-Humedad:** considerando que es importante el rápido equilibrio entre el medio de cultivo y la fase gaseosa aire- $\text{CO}_2$ , los frascos de cultivo no se cierran herméticamente por lo que hay que prevenir la evaporación para no variar la osmolaridad deseada. Se puede mantener la cámara de incubación con una humedad relativa cercana a la situación, utilizando agua a la misma temperatura.

Los elementos mencionados constituyen soluciones salinas balanceadas, son la base de medios más complejos y se utilizan para transporte, procesamiento y lavado de células. Las más comunes son Hanks y Earle.

Los medios de mantenimiento y crecimientos adicionan **nutrientes esenciales:**

**1-Aminoácidos:** se requieren para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos e incluso pueden actuar en el transporte de iones. Por la ausencia de ciertas enzimas, las células en cultivo no pueden producir todos los aminoácidos necesarios. *In vitro*, son trece los aminoácidos considerando esenciales que no pueden ser producidos por la propia célula. Ciertas células tienen un alto requerimiento de glutamina principalmente las transformadas.

**2-Vitaminas:** se requieren principalmente las del grupo B, muchas actúan como coenzimas.

**3-Sueros:** numerosos tipos de suero (bovino, humano, equino, etc.) han sido usados como complementos efectivos de los medios de cultivo para promover el crecimiento celular. La razón de su eficacia es que posee una gran cantidad de componentes con diferentes actividades promotoras del crecimiento. El suero completo posee la mayoría de los nutrientes necesarios para la división celular.

El más usado es el bovino (fetal, de recién nacido o adulto); como puede contener sustancias que interfieren con el crecimiento celular o su uso posterior, se prefiere el de animales pequeños. El suero de animales jóvenes es más efectivo que el de los adultos y el suero fetal usualmente es el preferido por carecer de actividad tóxica y de anticuerpos que puedan afectar el uso de los cultivos en experimentación viral. Debe estar controlado para bacterias, hongos, virus, y micoplasmas.

Su concentración puede utilizarse para regular el crecimiento del cultivo.

El **medio de mantenimiento** es usado para cultivar células con su metabolismo en estado basal por largos períodos de tiempo, varios días o aún semanas. Se utiliza el mismo MEM, con el agregado de concentraciones bajas de suero (2%).

El **medio de crecimiento** es más rico ya que se usa para activar el ciclo celular a través de la mitosis, incrementándose así el número de células. La concentración de suero puede aumentarse hasta un 10%.

**4-Otros:** hidrolizado de lactoalbúmina, caldo triptosa fosfato, plasma, extractos tisulares.

## Agua

La calidad del agua es de **fundamental importancia** en la preparación de todos los reactivos a utilizar. Debe ser desionizada, destilada y esterilizada.

Se usan intercambiadores iónicos que se controlan para verificar ausencia de bacterias y destiladores de vidrio para remover pirógenos y levaduras, es recomendable el uso de vidrio de borosilicato y goma de siliconas para procesamiento y envase. No debe almacenarse en grandes recipientes porque se contamina fácilmente con *Pseudomonas* spp.

## Antibióticos

Combinados con buenas técnicas de esterilidad ayudan a prevenir contaminaciones.

La gentamicina ofrece ventajas sobre otros antibióticos, especialmente por su actividad sobre algunas especies de *Micoplasmas* y *Pseudomonas*, su estabilidad a pH 2-10 a 37°C hasta 15 días y no interfiere con el crecimiento de RNA y DNA virus.

### **Agentes Dispersantes**

#### **Enzimas**

*Tripsina*: es la más utilizada para subcultivos, sola o con agentes quelantes (EDTA), también se usa en cultivos primarios. Proviene de páncreas porcino o bovino y puede ser fuente de contaminación con *Micoplasma*. Es inactivada por el suero.

*Pronasa*: es muy efectiva en células diploides y primarias pero no líneas continuas. No es inactivada por el suero.

*Colagenasa*: actúa sobre el colágeno, causa el menor daño en las células. Se utiliza preferentemente para clonado donde se requiere alta eficiencia de plaqueo.

#### **Quelantes**

*Versene* (EDTA): facilita la dispersión quelando los cationes divalentes que estabilizan los puentes intercelulares.

### **Aplicaciones de los cultivos celulares**

- Posibilitan el estudio de las funciones celulares tales como: síntesis de proteínas, flujo intracelular de hormonas, enzimas, regulación metabólica, transcripción de DNA, etc.
- Evaluaciones toxicológicas: acción de drogas, fármacos, cosméticos, pesticidas, alimentos, detergentes, etc.
- Detección de la actividad infecciosa de virus, rickettsias y clamidias, en materiales clínicos.
- Preparación de lotes de virus.
- Preparación de antígenos solubles para ELISA, FC.
- Preparación de improntas con células infectadas para detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes.

### **Mantenimiento de células en cultivo**

Las líneas celulares de **células dependientes de anclaje** son mantenidos en frascos de vidrio o plástico o en suspensión. La frecuencia de repique depende de cada línea celular, los medios utilizados, la temperatura de incubación. Pueden mantenerse casi confluentes disminuyendo el metabolismo celular, sin repicar, cambiando el medio por otro con menos suero o disminuyendo la temperatura por debajo de la óptima. Con este procedimiento se evita la manipulación excesiva del cultivo y el aumento innecesario de números de pasaje.

### **Subcultivo de células en monocapa**

El término subcultivo es sinónimo de pasaje o repique. Es la transferencia de un frasco de cultivo a otro.

Se desprende la monocapa de su soporte con tripsina y se siembra en recipientes de mayor superficie con el objetivo de amplificar la línea.

### **Conservación de células por congelación**

En la congelación de células se usan crioprotectores (glicerina o dimetilsulfóxido), sustancias que tienen la capacidad de ligar moléculas de agua y difundir a través de la membrana celular, disminuyendo la formación de cristales de agua y el consiguiente aumento de la concentración salina. Estos, además son de relativa baja citotoxicidad. Se usan en concentraciones finales que oscilan entre el 5 y el 15%.

### **Detección de los virus en los cultivos celulares**

El desarrollo de replicación viral, es decir, la amplificación del virus inoculado en el cultivo puede identificarse por medio de diferentes procedimientos. Todos ellos tienden a detectar las modificaciones producidas en el cultivo por efecto de la replicación viral.

Muchos virus replican con producción de *acción citopatogénica* (ACP), es decir, alteraciones de las monocapas celulares que se pueden observar directamente al microscopio óptico invertido "in vivo", sin necesidad de efectuar ninguna coloración.

El desarrollo en un cultivo celular de ACP permite reconocer que se ha aislado un virus. Sin embargo, es imposible en esta etapa poder afirmar de qué virus se trata, ya que la ACP es solamente orientadora debido a que muchos virus pueden desarrollar ACP de características similares. La identificación del virus aislado será la que permitirá el diagnóstico definitivo y se realiza en general por métodos inmunológicos. Dentro de ellos los más utilizados son la inmunofluorescencia y el ensayo de inmunoenzimas.

## **2.- Detección de partículas virales**

### **Microscopía electrónica**

La detección de un virus en una muestra clínica se puede llevar a cabo por la visualización del mismo mediante el microscopio electrónico. El costo elevado y la necesidad de personal entrenado han limitado su uso.

## **3.-Detección de antígenos**

### **Inmunofluorescencia (IF)**

Es un método altamente sensible y específico para la detección directa de un extenso número de antígenos virales en las muestras clínicas que contienen células infectadas. Su utilización incluye la detección de los virus respiratorios, Parotiditis, Sarampión, Rabia, Herpes simplex, Varicela-Zoster, Citomegalovirus.

Se puede utilizar indistintamente la técnica de IF directa o indirecta. En el caso de elegir la técnica indirecta debemos también disponer de los correspondientes sueros anti especie conjugados con isotiocianato de fluoresceína.

Cuando se implementa la técnica de IF directa, el anticuerpo antiviral está unido directamente al fluorocromo y la reacción requiere un solo paso de incubación del reactivo con la muestra acortándose así el tiempo de reacción.

La técnica de IF puede también ser utilizada para la detección de anticuerpos específicos. En este caso, el portaobjeto contiene las células con el antígeno viral conocido, sobre las áreas de células se colocan diluciones del suero del paciente y, en el caso de existir anticuerpos, estos serán detectados en un segundo paso mediante el agregado de un conjugado anti-IgG humanas del tipo IgG o IgM, según lo que se quiera determinar.

### **Enzimoimmunoensayo (EIE)**

La técnica de EIE consiste en adsorber antígenos o anticuerpos a tubos, esferas o cavidades de microplacas de poliestireno o cloruro de polivinilo. Dichas superficies tratadas permiten unir antígenos o anticuerpos específicos presentes en las muestras, los que luego se detectan con anticuerpos o antígenos complementarios conjugados con enzimas. Luego de las incubaciones y lavados, la actividad enzimática es determinada por la adición de un sustrato cuya concentración, obtenida por la medición de su absorbancia en un espectrofotómetro, es directamente proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa.

### **Métodos indirectos de estudio de los virus, serología**

La detección de anticuerpos es de gran utilidad diagnóstica cuando no pueden realizarse métodos directos (cultivo, PCR, inmunofluorescencia) para detectar el agente en la enfermedad aguda y para valorar inmunidad o la posibilidad de transmisión de ciertas infecciones virales.

La mayoría de las infecciones virales primarias inducen un aumento en el título de anticuerpos, que puede ser evidenciado por la titulación de sueros pareados: el primero obtenido tempranamente, suero agudo y el segundo en la convalecencia (15 a 21 días después). Los sueros deben ser procesados el mismo día y por el mismo método para evidenciar la presencia de seroconversión o de un aumento mayor que el cuádruple en el título de anticuerpos (por ejemplo: primer suero = 1/8 y segundo suero = 1/64).

La principal aplicación de los métodos serológicos es para determinar inmunidad frente a diferentes agentes virales.

Existen una variedad de métodos disponibles para determinar anticuerpos: fijación del complemento, Inmunofluorescencia indirecta, Enzimoimmunoensayo, Inhibición de la hemoaglutinación, Aglutinación del látex, Western-blot.

## Desarrollo Práctico N° 20

### Consignas

1. Observación al microscopio de un cultivo celular.
2. Realizar un subcultivo de un cultivo celular.

### Materiales necesarios

- Monocapa de células
- Botellas plásticas o de vidrios
- Pipetas de 5 ml (3)
- Tripsina-EDTA o Tripsina 0,25
- Medio de crecimiento

### Actividades

1. Observar al microscopio el cultivo que se va a repicar para ver si la monocapa es continua, uniforme, de morfología normal, etc.
2. Descartar el medio.
3. Utilizando una única pipeta de 5 ml, agregar: 1,1 y 2 ml de Tripsina-EDTA sucesivamente, descartando cada vez.
4. Esperar un minuto; descartar la mayor parte de la solución de tripsina dejando un residuo. Esperar unos minutos más, o poner el frasco a 37°C hasta observar indicios de desprendimiento celular.
5. Resuspender con 5 ml de medio de crecimiento y trasvasar al recipiente de cultivo 1 ml de medio (todo con una pipeta de 5 ml).
6. Diluir a la concentración deseada de células con medio de crecimiento.
7. Rotular: línea, número de pasaje, fecha.
8. Incubar a 37°C.

Agradecemos la colaboración en la confección de este trabajo práctico a la Bioquímica Lidia S. Amer.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Curso de Microbiología Clínica. Módulo 5. Diagnóstico virológico. Asociación Argentina de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de la provincia de Entre Ríos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas del Litoral.
- Guía de Trabajos prácticos de la cátedra de Virología. Carrera de Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Año 2006.

## Trabajo Práctico N° 21

### PARASITOLOGÍA

#### Objetivos

- Reconocer estructuras microscópicas y macroscópicas de parásitos humanos.

#### Importancia de los parásitos

La parasitología es la parte de la biología que estudia los fenómenos de dependencia entre seres vivos, En un sentido amplio, el parasitismo involucra a todos los organismos que pueden vivir sobre seres humanos: bacterias, virus hongos y parásitos. Pero el campo de la parasitología médica estudia los invertebrados (protozoos y metazoos) capaces de causar enfermedad en los seres humanos.

Algunas parasitosis son sumamente frecuentes en la práctica médica (oxiuriasis, giardiasis, pediculosis), otras son consideradas excepcionales en nuestro medio (anisakiasis y dracontiasis) y por último, otras se desarrollan en huéspedes inmunodeficientes (toxoplasmosis cerebral, estrongiloidiasis masiva).

Las parasitosis constituyen uno de los problemas de mayor importancia en salud pública. Basta mencionar, por ejemplo, que el paludismo se encuentra entre las 10 primeras causas de morbimortalidad en el mundo (2,5 millones de muertes anuales) y que el número de vermes adultos de *Ascaris lumbricoides*, que parasitan a la humanidad ha sido estimado en 7.800 millones como mínimo.

#### Clasificación de los parásitos de importancia médica

Los parásitos de los humanos se clasifican dentro del reino Animalia y están separados en dos subreinos: Protozoa y Metazoa (Tabla 21.1).

**Tabla 21.1.** Parásitos de importancia médica. Reino Animalia.

| Sub reino | Phylum                        |            | Organismo  | Ejemplos   |  |
|-----------|-------------------------------|------------|--|--|--|
| Protozoa  | Sarcodarios                   |            | Amebas   | <i>Entamoeba, Iodamoeba, Acanthamoeba, Endolimax</i>                       |  |
|           | Mastigophora                  |            | flagelados   | <i>Giardias, Tripanosomas, Trichomonas, Leishmanias,</i>                   |  |
|           | Ciliophora                    |            | Ciliados   | <i>Balantidium, Babesia</i>  |  |
|           | Apicomplexa                   |            | Esporozoos, coccidios  | <i>Toxoplasma, Plasmodium, Isospora, Cryptosporidium</i>                   |  |
| Metazoa   | Nematoda (Gusanos redondos)   |            |  | <i>Ascaris, Ancylostoma, Enterobius Strongyloides, Trichuris, Filarias</i> |  |
|           | Platelmintos (Gusanos planos) | Trematodos | Duelas   | <i>Fasciola, Schistosoma</i>   |  |
|           |                               | Cestodos   | Tenias   | <i>Tenias, Hymenolepis</i>   |  |
|           | Artrópoda                     | Arachnida  | Ácaros, garrapatas, arañas, escorpiones  |  |  |
|           |                               | Insecta    | Mosquitos, moscas, piojos, pulgas, hormigas, escarabajos, polillas, cucarachas, chinches |  |  |
|           |                               | Crustacea  | Cangrejos, langostinos, gambas, copépodos  |  |  |
| Chilopoda |                               | Ciempies   |  |  |  |

#### Relación huésped-parásito

Huéspedes, son aquellos seres (vertebrados o invertebrados) implicados en el ciclo evolutivo de los parásitos a los cuales reciben o alojan. Estos tienen uno o varios huéspedes en los que se desarrollan naturalmente.

Los hospedadores normales pueden ser:

1. *Huésped definitivo*: es aquel que alberga la forma adulta del parásito capaz de reproducirse.
2. *Huésped intermediario*: es aquel que alberga la forma larval del parásito.

3. *Huésped accidental*: es un huésped que no se halla involucrado en el ciclo natural de una parasitosis. Ejemplo: Coccidios del hígado de conejo por ingestión de quistes de *Eimeria*.
4. *Huésped paraténico*: es un huésped accidental en el cual el parásito no evoluciona, no puede continuar su ciclo habitual, pero puede sobrevivir alojado en los tejidos. Ejemplo: el hombre con las larvas de *Anquilostoma caninum* (del perro) que ingresan por piel y recorren superficialmente por debajo de la dermis ocasionando caminos serpenteantes muy pruriginosos.

### Ciclos Biológicos

El ciclo de vida es un conjunto de procesos que cumplen los parásitos para llegar al huésped, desarrollarse en él y producir formas infectantes que perpetúen la especie.

Los ciclos biológicos corresponden a dos tipos básicos:

1. *Directo o monoxénico*: el parásito tiene un solo huésped, a cuyo organismo llega sin la intervención de ningún otro ser. Formas infectantes: huevos embrionados, larvas, quistes o formas vegetativas, según el zooparásito del que se trate.
2. *Indirecto o heteroxénico*: los parásitos necesitan, para completar su evolución, un huésped que albergará la forma adulta del parásito (huésped definitivo), y uno o más huéspedes intermediarios donde se desarrollarán las demás formas evolutivas del mismo parásito.

**Fuentes de infección:** son aquellas fuentes que puedan determinar la infección del hombre. Ellas son:

- Agua y suelo contaminados
- Alimentos contaminados
- Insectos hematófagos
- Animales domésticos o silvestres que albergan el parásito
- Otras personas, sus vestidos o el medio ambiente inmediato que han contaminado
- Autoinfecciones repetidas

**Reservorios:** se llaman así a las especies (hombre, animales, vegetales) o suelo, o materias orgánicas que contengan parásitos u otros microorganismos que puedan vivir y multiplicarse en ellos y son fuentes de infección para un hospedador susceptible.

**Vectores:** son artrópodos u otros animales invertebrados que transmiten el parásito al huésped, bien sea por inoculación al picar, por depositar el material infectante en la piel o mucosas, o por contaminar alimentos u otros objetos. Los vectores pueden ser:

*Portadores mecánicos:* aquellos en que el agente patógeno es transportado en la superficie del vector. El vector es un transportador simple, no indispensable para la sobrevivencia natural del agente patógeno (mosca, cucaracha).

*Portadores biológicos:* los parásitos evolucionan o se multiplican en ellos, desarrollando alguna fase de su evolución. El vector biológico es un huésped indispensable para la sobrevivencia natural del agente patógeno (vinchuca, simúlido).

**Vías y mecanismos de infección:** para ingresar al huésped, los parásitos pueden elegir alguna de las siguientes vías:

- Digestiva
- Respiratoria
- Cutánea y mucosa
- Orificios de cavidades naturales
- Interhumana (Tabla 21.2)

La transmisión solo es posible si el parásito ha alcanzado el estado de desarrollo llamado "forma infectante" (estado de desarrollo del parásito con capacidad de ingresar en el huésped susceptible).

**Tabla 21.2.** Parásitos de transmisión interhumana (sin huésped intermediario).

| Vías de Transmisión              | Parásito                         | Parasitosis      |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| Transplacentaria                 | <i>Toxoplasma gondii</i>         | Toxoplasmosis    |
|                                  | <i>Trypanosoma cruzi</i>         | Mal de Chagas    |
| Sexual                           | <i>Trichomonas vaginalis</i>     | Tricomoniasis    |
|                                  | <i>Pthirus inguinalis</i>        | Piojo inguinal   |
|                                  | <i>Entamoeba histolítica</i>     | Amebiasis        |
| Contacto directo                 | <i>Enterobius vermicularis</i>   | Enterobiasis     |
|                                  | <i>Hymenolepis nana</i>          | Hymenolepiasis   |
|                                  | <i>Pediculus humanus</i>         | Pediculosis      |
|                                  | <i>Sarcoptes scabiei</i>         | Sarna            |
| Autoinfección o Autorreinfección | <i>Enterobius vermicularis</i>   | Enterobiasis     |
|                                  | <i>Strongyloides stercoralis</i> | Strongiloidiasis |
|                                  | <i>Hymenolepis nana</i>          | Hymenolepiasis   |
| Transfusión                      | <i>Trypanosoma cruzi</i>         | Mal de Chagas    |
|                                  | <i>Plasmodium</i> spp.           | Paludismo        |
|                                  | Tripanosomas africanos           | Tripanosomiasis  |
| Transplante                      | <i>Toxoplasma gondii</i>         | Toxoplasmosis    |
|                                  | <i>Trypanosoma cruzi</i>         | Mal de Chagas    |

Nota: existen otros parásitos que pueden usar estas mismas vías de transmisión pero con poca frecuencia.

### Infección y enfermedad parasitaria

*Infección parasitaria:* cuando un huésped alberga parásitos.

*Enfermedad parasitaria:* cuando el huésped presenta signos y síntomas como consecuencia del parasitismo.

*Factores determinantes para la manifestación de la enfermedad parasitaria*

- Del parásito: la cepa, virulencia, número de parásitos, tropismo por ciertos órganos.
- Del huésped: edad, raza, sexo, estado inmune, estado nutritivo, constitución genética.

### Clasificación clínica de las parasitosis

Los parásitos que afectan al hombre pueden asentarse en diferentes tejidos u órganos, dando lugar a enfermedades parasitarias que pueden clasificarse según cuatro criterios diferentes:

1. Según su localización en sistemas u órganos: enteroparasitosis, hemoparasitosis, histo-parasitosis, ectoparasitosis.
2. Según su afectación topográfica: endoparasitosis, ectoparasitosis.
3. Según la morfología del parásito: protozoosis, helmintiasis, artrópodos.
4. Según el grado de parasitismo: temporarias, permanentes.

En la Tabla 21.3 se detallan los mecanismos de transmisión y distribución de los parásitos patógenos humanos.

**Tabla 21.3.** Transmisión y distribución de los parásitos patógenos humanos.

| PROTOZOOS                       |                   |   |              |
|---------------------------------|-------------------|---|--------------|
| Protozoos intestinales          |                   |   |              |
| Organismo                       | Forma infección   | Mecanismo de contagio                       | Distribución |
| <i>Entamoeba histolytica</i>    | Quiste/trofozoíto | Indirecto (fecal-oral)<br>Directo (venéreo) | Mundial      |
| <i>Giardia lamblia</i>          | Quiste            | Fecal-oral                                  | Mundial      |
| <i>Dientamoeba fragilis</i>     | Trofozoíto        | Fecal-oral                                  | Mundial      |
| <i>Balantidium coli</i>         | Quiste            | Fecal-oral                                  | Mundial      |
| <i>Isospora belli</i>           | Ooquiste          | Fecal-oral                                  | Mundial      |
| Especies <i>Cryptosporidium</i> | Ooquiste          | Fecal-oral                                  | Mundial      |

| <b>Protozoos urogenitales</b>                            |   |   |                                     |
|--|---|---|-------------------------------------|
| <i>Trichomona vaginalis</i>                              | Trofozoíto                                | Directo (venéreo)   | Mundial                             |
| <b>Protozoos sanguíneos y tisulares</b>                  |   |   |                                     |
| Esp. <i>Naegleria y Acanthamoeba</i>                     | Quiste/trofozoíto                         | Inoculación directa, inhalación   | Mundial                             |
| Esp. <i>Plasmodium</i>                                   | Esporozoíto                               | Mosquito <i>Anopheles</i>   | Áreas tropicales y subtropicales    |
| <i>Toxoplasma gondii</i>                                 | Ooquistes y quistes tisulares             | Fecal-oral, ingestión de carne  | Mundial                             |
| Esp. <i>Leishmania</i>                                   | Promastigoto                              | Simúlido <i>Phlebotomus</i>   | Áreas tropicales y subtropicales    |
| <i>Tripanosoma cruzi</i>                                 | Tripomastigoto                            | Chinche reduído   | América                             |
| <i>Pneumocystis carinii</i>                              | Quiste                                    | Inhalación  | Mundial                             |
| <b>NEMATODOS</b>   |   |   |                                     |
| <i>Enterobius vermicularis</i>                           | Huevo                                     | Fecal-oral  | Mundial                             |
| <i>Ascaris lumbricoides</i>                              | Huevo                                     | Fecal-oral  | Condiciones sanitarias pobres       |
| Esp. <i>Toxocara</i>                                     | Huevo                                     | Fecal-oral  | Mundial                             |
| <i>Trichuris trichura</i>                                | Huevo                                     | Fecal-oral  | Mundial                             |
| <i>Ancylostoma duodenales</i>                            | Larva filariforme                         | Penetración cutánea directa de tierra contaminada   | Áreas tropicales y subtropicales    |
| <i>Necator americano</i>                                 | Larva filariforme                         | Penetración cutánea directa   | Áreas tropicales y subtropicales    |
| <i>Strongiloides stercoralis</i>                         | Larva filariforme                         | Penetración cutánea directa, autoinfección  | Áreas tropicales y subtropicales    |
| <i>Trichinella spiralis</i>                              | Larva enquistada en tejido                | Carnivorismo  | Mundial                             |
| <b>TREMATODOS</b>  |   |   |                                     |
| <b>Organismo</b>   | <b>Forma infección</b>                    | <b>Mecanismo de contagio</b>  | <b>Distribución</b>                 |
| <i>Fasciola hepática</i>                                 | Metacercaria                              | Metacercarias en plantas acuáticas  | Mundial                             |
| Esp. <i>Schistosoma</i>                                  | Cercaria                                  | Penetración directa de la piel x cercarias nadadoras libres   | África, Asia, India, Hispanoamérica |
| <b>CESTODOS</b>  |   |   |                                     |
| <b>Organismo</b>   | <b>Forma infección</b>                    | <b>Mecanismo de contagio</b>  | <b>Distribución</b>                 |
| <i>Taenia solium</i>                                     | Cisticerco, huevo embrionado o proglótide | Ingestión cerdo infectado, ingestión de huevos (cisticercosis)  | Países donde se consume cerdo       |
| <i>Taenia saginata</i>                                   | Cisticerco                                | Ingestión cisticercos en la carne   | Mundial                             |
| <i>Hymenolepsis nana</i><br><i>Hymenolepsis diminuta</i> | Cisticerco                                | Ingestión de huevos, fecal-oral. Ingestión de larvas de escarabajos infectados en cereal contaminado. | Mundial                             |

### Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades parasitarias

Se han descrito numerosos métodos para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, como se muestra en la Tabla 21.4.

Algunos tienen utilidad para detectar una amplia variedad de parásitos, mientras que otros son más específicos y solo tienen valor para detectar pocas especies o quizás una sola.

Mientras que la clave de la microbiología clínica diagnóstica es el aislamiento del patógeno causal en cultivo, el diagnóstico de las enfermedades parasitarias se basa casi por completo en la demostración morfológica (en general microscópica) de los parásitos en muestras clínicas. Ejemplo: quistes de *Entamoeba* y *Giardia*; huevos de *Ascaris*, *Uncinarias*, *Trichuris*, *Tenias* o *Hymenolepis*, o larvas de *Strongiloides*.

A veces, la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos (serodiagnóstico) tiene valor para establecer el diagnóstico. Ejemplo: Toxoplasmosis o Chagas. La detección de antígenos del organismo en suero, orina o heces puede proporcionar un método sensible y rápido para diagnosticar la infección por ciertos parásitos. De modo similar, el desarrollo reciente de técnicas basadas en sondas de ácidos nucleicos quizá se convierta en un medio excelente para la detección e identificación de parásitos en muestras biológicas, como sangre, heces, orina, esputos o biopsias tisulares.

**Tabla 21.4.** *Métodos de laboratorio usadas para el diagnóstico de enfermedades parasitarias.*

|                                   |
|-----------------------------------|
| <i>Examen macroscópico</i>        |
| <i>Examen microscópico</i>        |
| Preparaciones húmedas             |
| Tinciones permanentes             |
| Concentrados de heces             |
| <i>Serología</i>                  |
| Respuesta de anticuerpos          |
| Detección de antígenos            |
| <i>Sondas de ácidos nucleicos</i> |
| Detección                         |
| Identificación                    |
| <i>Cultivo</i>                    |
| <i>Inoculación en animales</i>    |
| <i>Xenodiagnóstico</i>            |

### **Examen macroscópico**

La consistencia de las heces (formadas, semiformadas, blandas o líquidas) puede proporcionar una indicación del estadio del protozooario presente. Cuando el contenido de agua de la materia fecal disminuye durante su pasaje normal por el tracto intestinal los trofozoítos del protozooario se enquistan para poder sobrevivir. Los trofozoítos (formas móviles) de los protozoarios intestinales se encuentran usualmente en las muestras líquidas o blandas y en forma ocasional en las semiformadas; el estadio de quiste se encuentra normalmente en las heces formadas o semiformadas y rara vez en las muestras líquidas.

Los huevos y larvas de helmintos pueden encontrarse en cualquier tipo de muestra aunque la posibilidad de hallar un parásito en las heces líquidas será menor debido al factor de dilución.

Ocasionalmente pueden observarse en la superficie de las heces formas adultas de helmintos como *Ascaris lumbricoides* o *Enterobius vermicularis* (oxiuro). También pueden observarse allí proglótides de tenias o bien estos pueden escurrirse por la muestra y encontrarse en el fondo del recipiente.

La observación de sangre en las heces puede deberse a diversas causas y siempre debe ser informada. En ciertas infecciones parasitarias se observan sangre y mucus, que deben ser examinadas con cuidado en busca de trofozoítos de amebas.

### **Examen microscópico**

La identificación de los protozoarios y huevos de helmintos en materia fecal está basada en el reconocimiento de sus características morfológicas específicas.

A continuación se describen los elementos parasitarios pertenecientes a parásitos de hallazgo frecuente en nuestra región y país.

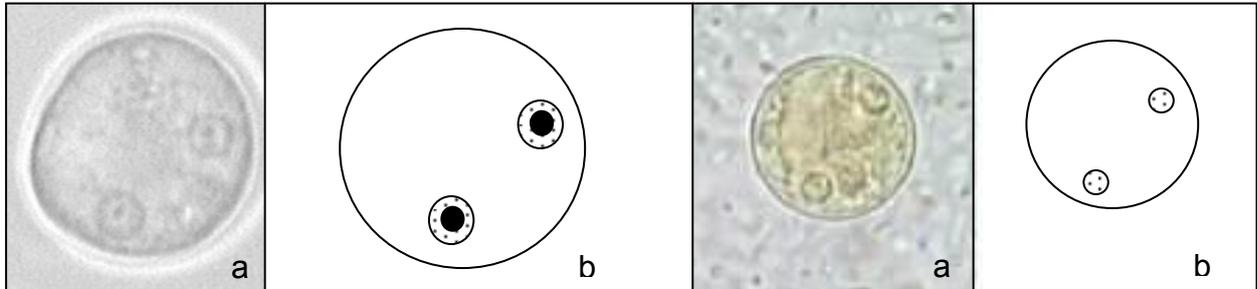
## PROTOZOOS

### ***Entamoeba histolytica*** (Quiste)

**Tamaño:** 10-20  $\mu$ , esféricos.

**Núcleo:** 4 en quistes maduros. Puede haber menos de 4 en quistes inmaduros, pero nunca hay más de 4. Cariosoma diminuto, usualmente central, pero puede variar de posición. Cromatina delicada, uniformemente distribuida a lo largo de la membrana nuclear (Figura 21.1).

**Citoplasma:** 10% de los quistes pueden tener barras cromatoides, de extremos lisos, redondeados. En prequiste precoz puede verse una vacuola de glucógeno.



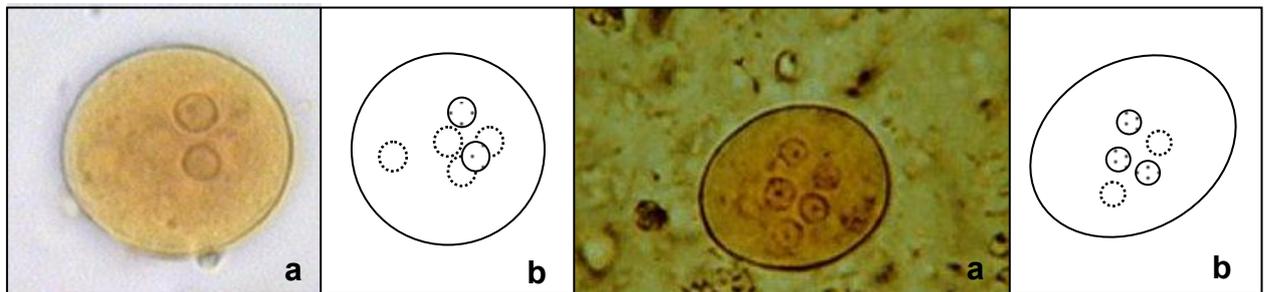
**Figura 21.1.** a) Quiste de *E. histolytica*, b) Esquema.

### ***Entamoeba coli*** (Quiste)

**Tamaño:** 10-35  $\mu$ , usualmente esféricos, rara vez ovals o triangulares.

**Núcleo:** 8 o rara vez 16 núcleos en quistes maduros. En quistes inmaduros hay 1-8. Cromatina periférica gruesa y granular, distribuida irregularmente en agregados, algo más homogéneos que en los trofozoítos. Cariosoma usualmente excéntrico, pero puede ser central (Figura 21.2).

**Citoplasma:** barras cromatoides infrecuentes, pero con extremos irregulares, astillados. En el prequiste se puede ver una vacuola de glucógeno.



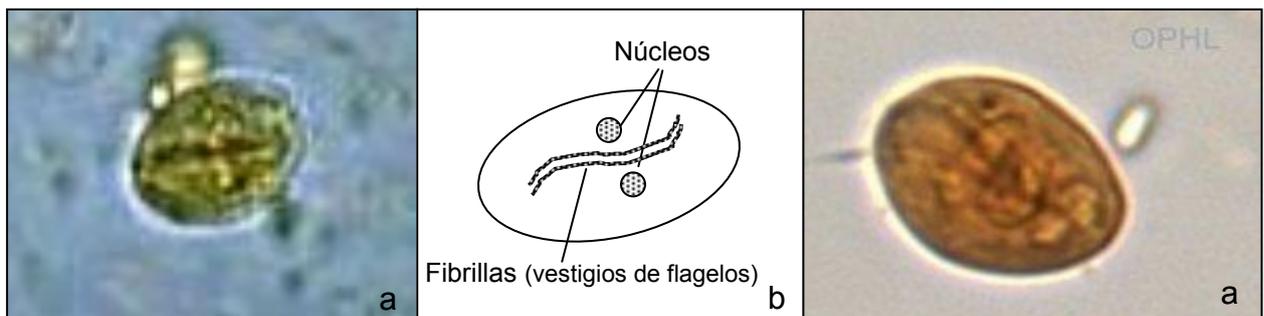
**Figura 21.2.** a) Quiste de *Entamoeba coli*, b) Esquema.

### ***Giardia lamblia*** (quiste)

**Tamaño:** 8-12  $\mu$  de largo, 7-10  $\mu$  de ancho, ovals.

**Núcleo:** hay 4. Cariosoma excéntrico. No hay cromatina periférica en la membrana nuclear.

**Citoplasma:** espacio claro entre la pared quística y el citoplasma, que produce un efecto de "halo" fácil de reconocer. Pueden verse fibrillas longitudinales mal definidas. Hay 4 cuerpos medianos (Figura 21.3).



**Figura 21.3.** a) Quiste de *Giardia*, b) Esquema.

**Trichomonas vaginalis (trofozoíto)**

Tamaño: 7-15  $\mu$  de largo, 4-7  $\mu$  de ancho, en forma de lágrima.

Movilidad: activa, nerviosa, de tipo flecha.

Núcleo: único anterior. Cariosoma central pequeño. Cromatina distribuida desigualmente en la membrana nuclear.

Citoplasma: axostilo central, longitudinal. Marca longitudinal (costa) en el sitio de adosamiento de la membrana ondulante, que recorre la mitad del largo del cuerpo (en la *T. hominis* se extiende a todo el largo del cuerpo).

Flagelos: 3 a 5 anteriores, 1 posterior. Usualmente difíciles de ver (Figura 21.4).

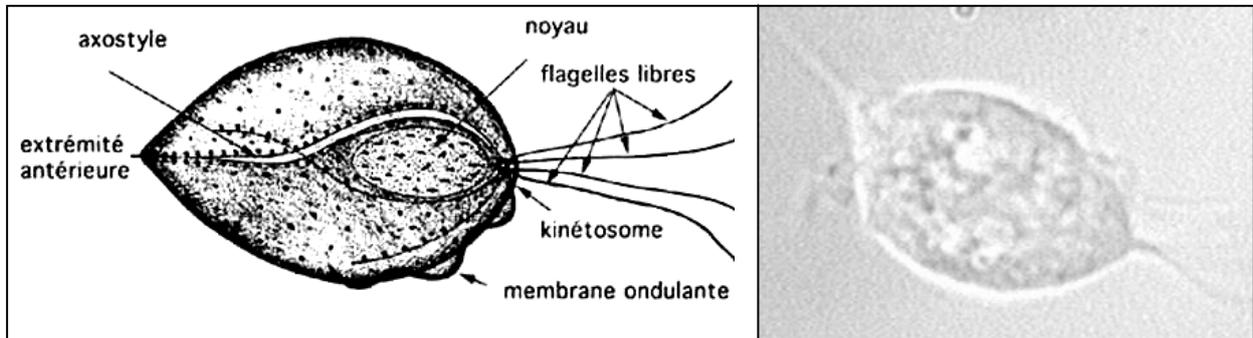
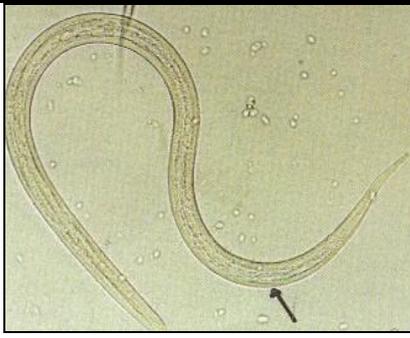


Figura 21.4. a) Esquema del trofozoíto spp, b) Trofozoíto en heces (sin tinción).

**NEMATODES**

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>Ascaris lumbricoides (huevo)</b></p> <p>Tamaño: 60-45 <math>\mu</math>, redondos u ovoides, cáscara gruesa con cubierta albuminosa gruesa dispuesta en mamelones irregulares; célula interior en diversos estadios de división. Color marrón.</p>   |  |  |
| <p>Las enzimas digestivas pueden disolver la cubierta albuminosa, quedando el huevo con una superficie lisa decorticada.</p>  |  |  |
| <p><b>Enterobius vermicularis (huevo)</b></p> <p>Tamaño: 55 x 26 <math>\mu</math><br/>Morfología: elongados, asimétricos, con un lado aplanado y el otro convexo. Cáscara fina y lisa; suelen contener larvas bien desarrolladas, que se ven sobre todo en preparados de cinta adhesiva (Test de Graham).</p> |  |  |

|   |   |
|---|---|
| <p><b><i>Trichuris trichiura</i> (huevo)</b></p> <p>Tamaño: 54 x 22 <math>\mu</math>, alongados.<br/>Morfología: en forma de barril, con “tapón” hialino polar en cada extremo. Cáscara amarilla a marrón, tapones incoloros.</p>   |   |
| <p><b><i>Ancylostoma duodenale</i> (huevo)</b></p> <p>Tamaño: 60 x 40 <math>\mu</math>, ovals o elipsoides. Cáscara de pared fina, lisa e incolora. División interna usualmente bien desarrollada, en un estadio de 4 a 8 células, bien separadas de la cáscara dejando un espacio vacío.</p>                                     |   |
| <p><b><i>Strongiloides stercoralis</i> (larva)</b></p> <p>Tamaño: 200-300 <math>\mu</math> de largo x 15 <math>\mu</math> de grosor.<br/>Morfología: tubo digestivo fácilmente visible con un esófago en el extremo redondeado y el poro anal en el extremo ahusado. El primordio genital se observa en la mitad de la larva.</p> |  |

## CESTODES

|   |  |
|---|--|
| <p><b><i>Taenia</i> spp (huevos)</b></p> <p>Tamaño: 31 x 43 <math>\mu</math>.<br/>Morfología: esféricos o subsféricos, de cáscara gruesa con estrías radiales prominentes. La oncosfera embrionada con tres pares de ganchitos dentro de la cáscara posee valor diagnóstico el género (la identificación de especies de tenias no se puede hacer en base a la morfología de los huevos).</p>  |  |
| <p><b><i>Hymenolepis nana</i> (huevos)</b></p> <p>Tamaño: 40 a 60 <math>\mu</math>.<br/>Morfología: ovals o subsféricos. Cáscara formada por dos membranas definidas: la externa es relativamente fina y de superficie lisa; la interna tiene dos polos opuestos de los que emergen 4 a 8 filamentos que se extienden entre ambas membranas. Dentro de la membrana interna hay una oncosfera con tres pares de ganchitos (huevo hexacanto).</p> |  |

## Desarrollo Práctico N° 21

### Consignas

1. Observación al microscopio de protozoos: quistes de *Ameba coli* y *Giardia lamblia* y trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*.
2. Observación al microscopio de helmintos: huevos de *Áscaris lumbricoides*, *Taenia* spp, *Ancylostoma* (Uncinarias), *Enterobius vermicularis*, *Himenolepis nana* y larvas de *Strongyloides stercoralis*.
3. Observación de artrópodos: huevos y formas adultas de *Pediculitis capitis*. Diferenciar los sexos.

### Materiales necesarios

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Solución de lugol
- Solución fisiológica
- Varillas de vidrio
- Materia fecal
- Flujo vaginal

### Actividades

1. Realizar el montaje de las muestras con solución de lugol o fisiológica en función de lo que se desea observar.
2. Observar al microscopio óptico.
3. Observar huevos y formas adultas de *Pediculitis capitis* y diferenciar sexos.
4. Esquematizar en cada caso las observaciones microscópicas realizadas indicando el aumento y medidas relativas de los distintos elementos visualizados.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atías Antonio. Parasitología Médica. Ed. Mediterráneo. 1999.
- Murray, P. R.; Resenthal, K., Kobayashi, G. S. y Pfaller, M. A. Microbiología Médica. Cuarta edición. Elsevier España S. A. 2005.
- Microbiología clínica. Diagnóstico parasitológico. Cuadernillo 7 del Curso de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología.
- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7° Edición. Finegold/Barón. Ed. Panamericana. 1989.
- Koneman, E.W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Ed. Panamericana. 1983.
- WHO. Manual of basic techniques for a health laboratory. World Health Organization. Geneva. 1980.

## Anexo N° 1. Práctico N°11

### Conceptos

#### Potenciales redox

El potencial de Oxido Reducción (Eh) de una pareja REDOX es la medida en VOLTIOS de la tendencia espontánea a donar o recibir electrones por parte de uno de los integrantes de la pareja (flujo de electrones). Una pareja REDOX posee una forma reducida (dador de electrones) y una forma oxidante (receptor de electrones).

Reductor <---> oxidante + electrones. En consecuencia cuanto menor sea la cantidad de formas oxidantes menor o más bajo será el potencial REDOX. La presencia de O<sub>2</sub> en los cultivos o en el medio natural debe ser eliminada imprescindiblemente del microclima de desarrollo (O<sub>2</sub> atmosférico y en solución. Aún más el descenso de los Eh debe afirmarse con la presencia en el medio de sustancias reductoras que superen en gran número a las oxidantes.

#### Flora normal anaerobia

El hombre conjuntamente con los animales (mamíferos, aves, peces) es hospedero en sus epitelios, mucosas y aparatos de un gran número de especies y de un gran número de individuos anaeróbicos. Estos son miembros de una FLORA NORMAL beneficiosa y hasta, en algunos casos, esenciales para la vida. El conocimiento de esta flora normal es importante desde varios ángulos. Si pensamos que muchas infecciones anaeróbicas se desarrollan en la vecindad de las superficies mucosas en las cuales estos gérmenes predominan como flora autóctona, el conocimiento de la misma se presenta de gran utilidad para sospechar quienes estarían involucrados en los procesos infecciosos. Esta información ayuda al clínico para establecer una antibioticoterapia empírica racional y al microbiólogo para seleccionar los medios de cultivo más apropiados al aislamiento e identificación bacterianos. La Tabla A.1 muestra el predominio de las especies más comunes como flora normal humana según diferentes localizaciones.

**Tabla A.1.** Predominio de las especies más comunes como flora normal humana según diferentes localizaciones.

| Flora normal  | Piel | V.R.S. (#) | Boca | Intestino | Genitales externos | Uretra | Vagina |
|---|------|------------|------|-----------|--------------------|--------|--------|
| Bacilos Gram (+) esporulados<br><b>Clostridia</b>     | 0    | 0          | 1    | 3         | 0                  | 1      | 1      |
| Bacilos Gram (+) no esporulados<br><b>Actinomyces</b> | 0    | 2          | 2    | 1         | 0                  | 0      | 0      |
| <b>Bifidobacterium</b>                                | 0    | 0          | 2    | 1         | 0                  | 0      | 2      |
| <b>Eubacterium</b>                                    | 1    | 1          | 2    | 3         | d                  | d      | 1      |
| <b>Lactobacillus (*)</b>                              | 0    | 0          | 2    | 2         | 0                  | 1      | 3      |
| <b>Propionibacterias</b>                              | 3    | 2          | 1    | 1         | d                  | 0      | 2      |
| Bacilos Gram (-) no esporulados<br><b>Bacteroides</b> | 0    | 2          | 3    | 2         | 2                  | 2      | 2      |
| <b>Fusobacterium</b>                                  | 0    | 2          | 3    | 2         | 2                  | 2      | 1      |
| <b>Cocos G (+)</b>                                    | 2    | 2          | 3    | 3         | 2                  | 1      | 2      |
| <b>Cocos G (-)</b>                                    | 0    | 2          | 3    | 2         | 0                  | d      | 2      |

(#) Vías Respiratorias Superiores: incluye vías nasales. Orofaringe y amígdalas.

(\*) Incluye anaerobios, facultativos y microaerofilos.

(d = desconocido) (0 = no encontrados o raros) (1 = hallazgo irregular) (2 = habitualmente presentes) (3 presentes).

## Anexo N° 2. Trabajo Práctico N° 12

### Puntos de corte para la interpretación del método de Kirby Bauer

| Agente antimicrobiano                             | Contenido del disco | Diámetro de la zona de inhibición en mm |            |                   |
|---|---------------------|---|------------|-------------------|
|   |                     | Resistente<br>< o =                     | Intermedio | Sensible<br>> o = |
| <b>BETALACTAMICOS. PENICILINAS</b>                |                     |   |            |                   |
| Ampicilina Enterobacteriaceae                     | 10 µg               | 13                                      | 14-16      | 17                |
| Estafilococos                                     | 10 µg               | 28                                      | ---        | 29                |
| Enterococos                                       | 10 µg               | 16                                      | ---        | 17                |
| Estreptococos β-hemolíticos                       | 10 µg               | 18                                      | 19 - 25    | 26                |
| Oxacilina Estafilococo                            | 1 µg                | 10                                      | 11-12      | 13                |
| Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina | 1 µg                | ---                                     | ---        | 20                |
| Penicilina G Estafilococos                        | 10 U                | 28                                      | ---        | 29                |
| Enterococos                                       | 10 U                | 14                                      | ---        | 15                |
| Estreptococos β-hemolíticos                       | 10 U                | 19                                      | 20-27      | 28                |
| Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | 100 µg              | 17                                      | ---        | 18                |
| Enterobacteriaceae                                | 100 µg              | 17                                      | 18-20      | 21                |
| <b>COMBINACIÓN CON INHIBIDORES β-LACTAMASA</b>    |                     |   |            |                   |
| Amoxicilina/Acido clavulánico Estafilococo        | 20/10 µg            | 19                                      | ---        | 20                |
| Enterobacteriaceae                                | 20/10 µg            | 13                                      | 14-17      | 18                |
| Ampicilina/Sulbactama                             | 10/10 µg            | 11                                      | 12-14      | 15                |
| Piperacilina/Tazobactama Enterobacterias          | 100/10 µg           | 17                                      | 18-20      | 21                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | 100/10 µg           | 17                                      | ---        | 18                |
| Estafilococos Meticilina S                        | 100/10              | 17                                      | ---        | 18                |
| <b>CEFALOSPORINAS</b>                             |                     |   |            |                   |
| Cefaclor  | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Cefazolina  | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Cefepime  | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Cefixima  | 5 µg                | 15                                      | 16-18      | 19                |
| Cefoperazona                                      | 75 µg               | 15                                      | 16-20      | 21                |
| Cefotaxima  | 30 µg               | 14                                      | 15-22      | 23                |
| Cefoxitina  | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Ceftazidima                                       | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Ceftixozima                                       | 30 µg               | 14                                      | 15-19      | 20                |
| Ceftriaxona                                       | 30 µg               | 13                                      | 14-20      | 21                |
| Cefuroxima sodica parenteral                      | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| Cefalotina  | 30 µg               | 14                                      | 15-17      | 18                |
| <b>CARBAPENEMS</b>                                |                     |   |            |                   |
| Imipenem  | 10 µg               | 13                                      | 14-15      | 16                |
| Meropenem   | 10 µg               | 13                                      | 14-15      | 16                |
| <b>MONOBACTAMAS</b>                               |                     |   |            |                   |
| Aztreonam   | 30 µg               | 15                                      | 16-21      | 22                |
| <b>GLICOPEPTIDOS</b>                              |                     |   |            |                   |
| Teicoplanina                                      | 30 µg               | 10                                      | 11-13      | 14                |
| Vancomicina Enterococos                           | 30 µg               | 14                                      | 15-16      | 17                |
| Estafilococos                                     | 30 µg               | ---                                     | ---        | 15                |
| <b>AMINOGLUCOSIDOS</b>                            |                     |   |            |                   |
| Amicacina   | 30 µg               | 14                                      | 15-16      | 17                |
| Gentamicina                                       | 10 µg               | 12                                      | 13-14      | 15                |
| Kanamicina  | 30 µg               | 13                                      | 14-17      | 18                |
| Netilmicina                                       | 30 µg               | 12                                      | 13-14      | 15                |

| MACROLIDOS                  |               |    |       |    |
|-----------------------------|---------------|----|-------|----|
| Azitromicina                | 15 µg         | 13 | 14-17 | 18 |
| Claritromicina              | 15 µg         | 13 | 14-17 | 18 |
| Eritromicina                | 15 µg         | 13 | 14-22 | 23 |
| TETRACICLINAS               |               |    |       |    |
| Minociclina                 | 30 µg         | 15 | 16-20 | 21 |
| Tetraciclina                | 30 µg         | 15 | 16-18 | 19 |
| QUINOLONAS                  |               |    |       |    |
| Ciprofloxacina              | 5 µg          | 15 | 16-20 | 21 |
| Levofloxacina               | 5 µg          | 15 | 16-18 | 19 |
| Nalidixico Acido            | 30 µg         | 13 | 14-18 | 19 |
| Norfloxacina                | 10 µg         | 12 | 13-16 | 17 |
| Ofloxacina                  | 5 µg          | 12 | 13-15 | 16 |
| Trovafloxacina              | 10 µg         | 13 | 14-1  | 17 |
| OTROS ANTIMICROBIANOS       |               |    |       |    |
| Cloranfenicol               | 30 µg         | 12 | 1-17  | 18 |
| Clindamicina                | 2 µg          | 14 | 15-20 | 21 |
| Nitrofurantoina             | 300 µg        | 14 | 15-16 | 17 |
| Rifampicina                 | 5 µg          | 16 | 17-19 | 20 |
| Sulfonamidas                | 300 µg        | 12 | 13-16 | 17 |
| Trimetoprima-Sulfametoxazol | 1.25/23.75 µg | 10 | 11-15 | 16 |

### Anexo N° 3. Trabajo Práctico N° 14

Números más probables (NMP) para 1 g de muestra, usando 3 tubos con porciones de ensayo de 0,1g, 0,01g y 0,001 g.

| 0,1<br>(10 <sup>-1</sup> ) | 0,01<br>(10 <sup>-2</sup> ) | 0,001<br>(10 <sup>-3</sup> ) | NMP |  | 0,1<br>(10 <sup>-1</sup> ) | 0,01<br>(10 <sup>-2</sup> ) | 0,001<br>(10 <sup>-3</sup> ) | NMP   |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----|--|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------|
| 0                          | 0                           | 0                            | <3  |  | 2                          | 0                           | 0                            | 9,1   |
| 0                          | 0                           | 1                            | 3   |  | 2                          | 0                           | 1                            | 14    |
| 0                          | 0                           | 2                            | 6   |  | 2                          | 0                           | 2                            | 20    |
| 0                          | 0                           | 3                            | 9   |  | 2                          | 0                           | 3                            | 26    |
| 0                          | 1                           | 0                            | 3   |  | 2                          | 1                           | 0                            | 15    |
| 0                          | 1                           | 1                            | 6,1 |  | 2                          | 1                           | 1                            | 20    |
| 0                          | 1                           | 2                            | 9,2 |  | 2                          | 1                           | 2                            | 27    |
| 0                          | 1                           | 3                            | 12  |  | 2                          | 1                           | 3                            | 34    |
| 0                          | 2                           | 0                            | 6,2 |  | 2                          | 2                           | 0                            | 21    |
| 0                          | 2                           | 1                            | 9,3 |  | 2                          | 2                           | 1                            | 28    |
| 0                          | 2                           | 2                            | 12  |  | 2                          | 2                           | 2                            | 35    |
| 0                          | 2                           | 3                            | 16  |  | 2                          | 2                           | 3                            | 42    |
| 0                          | 3                           | 0                            | 9,4 |  | 2                          | 3                           | 0                            | 29    |
| 0                          | 3                           | 1                            | 13  |  | 2                          | 3                           | 1                            | 36    |
| 0                          | 3                           | 2                            | 16  |  | 2                          | 3                           | 2                            | 44    |
| 0                          | 3                           | 3                            | 19  |  | 2                          | 3                           | 3                            | 53    |
| 1                          | 0                           | 0                            | 3,6 |  | 3                          | 0                           | 0                            | 23    |
| 1                          | 0                           | 1                            | 7,2 |  | 3                          | 0                           | 1                            | 39    |
| 0                          | 0                           | 2                            | 11  |  | 3                          | 0                           | 2                            | 64    |
| 1                          | 0                           | 3                            | 15  |  | 3                          | 0                           | 3                            | 95    |
| 1                          | 1                           | 0                            | 7,3 |  | 3                          | 1                           | 0                            | 43    |
| 1                          | 1                           | 1                            | 11  |  | 3                          | 1                           | 1                            | 75    |
| 1                          | 1                           | 2                            | 15  |  | 3                          | 1                           | 2                            | 120   |
| 1                          | 1                           | 3                            | 19  |  | 3                          | 1                           | 3                            | 160   |
| 1                          | 2                           | 0                            | 11  |  | 3                          | 2                           | 0                            | 93    |
| 1                          | 2                           | 1                            | 15  |  | 3                          | 2                           | 1                            | 150   |
| 1                          | 2                           | 2                            | 20  |  | 3                          | 2                           | 2                            | 210   |
| 1                          | 2                           | 3                            | 24  |  | 3                          | 2                           | 3                            | 290   |
| 1                          | 3                           | 0                            | 16  |  | 3                          | 3                           | 0                            | 240   |
| 1                          | 3                           | 1                            | 20  |  | 3                          | 3                           | 1                            | 460   |
| 1                          | 3                           | 2                            | 24  |  | 3                          | 3                           | 2                            | 1100  |
| 1                          | 3                           | 3                            | 29  |  | 3                          | 3                           | 3                            | >1100 |

Table 966.24A, "Official Methods of Analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> Edition, 1995. Volumen I. Supplement March 1996. Chapter 17. Microbiological Methods".