



RILSA

MANUAL ILUSTRADO DE TECNICAS DE
LABORATORIO UTILIZADAS EN
BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA
VETERINARIAS

RED INTERAMERICANA DE LABORATORIOS DE
SALUD ANIMAL

PROGRAMA V: SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL

OFICINA EN MEXICO

Digitized by Google

MEXICO 636.089 R3125m 1988

CH



RILSA

**MANUAL ILUSTRADO DE TECNICAS DE
LABORATORIO UTILIZADAS EN
BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA
VETERINARIAS**

ISBN 92-9039-146-4
México, D.F.
Noviembre, 1988

**RED INTERAMERICANA DE LABORATORIOS DE
SALUD ANIMAL**

PROGRAMA V: SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL

OFICINA EN MEXICO

IICA
#2453
1988

**MANUAL ILUSTRADO PARA
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA
Y MICOLOGIA VETERINARIA**

M.V.Z. RAUL GARCIA TINAJERO.

M.V.Z. RODOLFO CORDOBA PONCE.

Profesores de la Cátedra de Microbiología
Veterinaria. Departamento de Ciencias
Biológicas. Sección de Microbiología.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.
U.N.A.M. México.

Cuautitlan Izcalli, Estado de México. 1988.

This One



G9TG-HNG-UBUO

COLECCION ESPECIAL
NO SACAR DE LA BIBLIOTECA
IICA - CIDA

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, dependiente del Departamento de Ciencias Biológicas, -- Sección de Microbiología, de la Facultad de Estudios Superiores -- Cuautitlán. U.N.A.M.

COLABORADORES

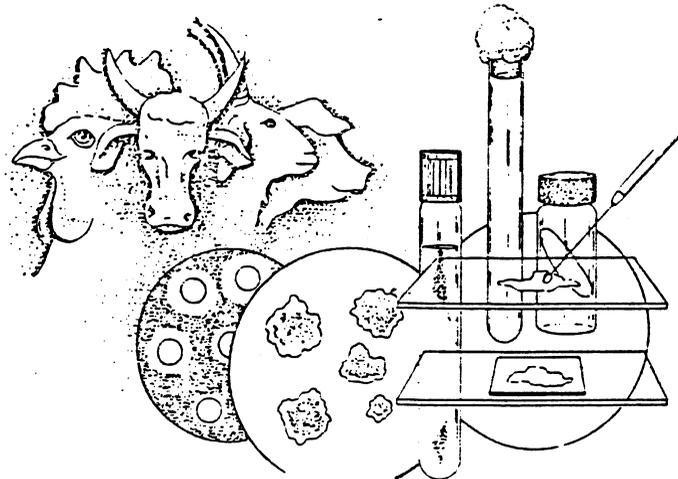
M.V.Z Ph.D. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES.
Jefe del Departamento de Ciencias Biológicas
y Profesor de la Cátedra de Micología Médica
de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.

M.V.Z. GILBERTO OCHOA URIBE
Jefe de la Sección de Microbiología
y Profesor de la Cátedra de Enfermedades
Infecciosas, de la Facultad de Estudios
Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.

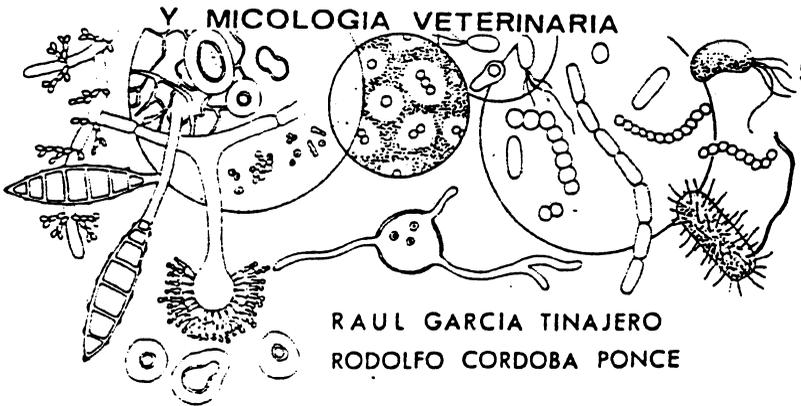
M.V.Z. TONATIUH CRUZ SANCHEZ.
Profesor de la Cátedra de Inmunología
Veterinaria y Micología Médica, de la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.

M.V.Z. LUZ MA. ORTEGA LEYVA.
Profesora de las Cátedras de Microbiología
e Inmunología Veterinaria, de la Facultad
de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.

REGISTRADO EN LA DIRECCION GENERAL DE DERECHOS DE
AUTOR, S.E.P. 7999/85 (13860). Todos los dere-
chos reservados, ninguna parte de esta publicación
puede ser reproducida ó transmitida por otro medio
** electrónico, mecánico, fotocopador, registra -
dor, etc. ** sin permiso previo por escrito de los
Autores.



**MANUAL ILUSTRADO PARA
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA
Y MICOLOGIA VETERINARIA**



**RAUL GARCIA TINAJERO
RODOLFO CORDOBA PONCE**

P R E S E N T A C I O N

El propósito de este manual es describir en forma concisa y accesible las técnicas y procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades de los animales causadas por hongos y bacterias.

Fue elaborado con el objeto de llenar el vacío que en ocasiones existe en los laboratorios de diagnóstico, en cuanto al conocimiento de ciertas técnicas de diagnóstico en estas dos ramas de la Medicina Veterinaria.

Se considera que resulta una herramienta útil al Médico Veterinario en su actividad dentro del laboratorio ya que mediante su utilización podrá establecer diagnósticos en forma rápida y certera y contribuir con ello al control de brotes de enfermedades.

El IICA reconoce el esfuerzo y dedicación de los Médicos Veterinarios Raúl García Tinajero y Rodolfo Córdoba Ponce, en la elaboración del presente manual, el cual, originalmente constituyó su tesis profesional de licenciatura y más tarde fue adoptado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos para la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario; asimismo, agradece la cesión de los derechos para que se produzca y sea utilizado como una referencia útil para los países americanos.

RAUL ALCOCER BENITEZ
Especialista en Salud Animal
IICA/México.

INDICE

Págs.

INTRODUCCION

OBJETIVOS

I. RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS	6
A. RECOLECCION DE ORGANOS Y TEJIDOS	9
B. RECOLECCION DE SANGRE	16
C. RECOLECCION DE ORINA	22
D. RECOLECCION DE LECHE	26
E. RECOLECCION DE MUESTRAS DE HERIDAS ABIERTAS, ABSCESOS Y EXUDADOS	28
F. RECOLECCION DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO	31
G. RECOLECCION DE HECES	32
H. RECOLECCION DE SEMEN	33
I. MUESTRAS DE FETO Y PLACENTA	34
J. RECOLECCION DE EXUDADO PREPUCIAL Y VAGINAL	38
K. RASPADO CUTANEO	40
L. RECOLECCION DE AGUA Y ALIMENTOS	41
M. MUESTRAS DE BIOLÓGICOS Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS	44
II. BACTERIOLOGIA	52
A. DEMOSTRACION	53
1. Clasificación morfológica de las bacterias	54
2. Observación de microorganismos sin teñir	57
3. Técnicas de tinción	58
3.1 Preparación de un frotis fijo para tinción	60
3.2 Tinciones simples	62
3.3 Tinciones diferenciales	62

	Págs.
a. Tinción de Gram	62
a.1 Modificación de Hucker	63
a.2 Modificación de Reed	67
a.3 Prueba de KOH al 3%	69
b. Tinción de ácidos resistentes	70
b.1 Método de Ziehl-Neelsen	71
b.2 Método de Kinyoun	74
3.4 Tinción de estructuras	74
a. Tinción de esporas	75
a.1 Método de Shaeffer y Fulton	76
a.2 Método de coloración para esporas en frío	78
b. Tinción de cápsula	78
b.1 Tinción de cápsula con nigrosina	80
b.2 Método de Muir para cápsula	82
c. Tinción de flagelos	82
c.1 Método de Leifson para coloración de flagelos	83
d. Tinción de espiroquetas	86
3.5 Técnicas automatizadas de tinción	87
B. AISLAMIENTO	87
1. Medios de cultivo	88
1.1 Clasificación de medios de cultivo	92
a. Medios de cultivo básicos	92
b. Medios enriquecidos	92
c. Medios de enriquecimiento	93
d. Medios selectivos	93
e. Medios diferenciales	95
f. Medios para el estudio de carbohidratos	95
g. Medios de transporte	96

	Págs.
1.2 Preparación y distribución de los medios de cultivo	96
a. Preparación y distribución del agar en cajas de Petri	98
b. Preparación de agar sangre y agar chocolate	101
c. Distribución del medio de cultivo en tubos	104
2. Técnicas de sembrado en los diferentes medios de cultivo	106
2.1 Inoculación de medio sólido en caja de Petri	108
2.2 Inoculación de tubos con agar inclinado	114
2.3 Inoculación de tubos con medio sólido horizontal	115
2.4 Inoculación de medios semisólidos	116
2.5 Inoculación de medios líquidos	117
C. IDENTIFICACION	123
1. Pruebas de reacción simple	126
1.1 Prueba de catalasa	126
1.2 Prueba de motilidad	129
1.3 Prueba de oxidasa	132
1.4 Prueba de ácido de glucosa	135
1.5 Prueba de óxido-fermentación	136
1.6 Prueba de citrato	138
1.7 Prueba de malonato	141
1.8 Reacción de ureasa	144
1.9 Prueba de reducción del nitrato	146
1.10 Prueba de rojo de metilo y Voges Proskauer	149
2. Pruebas de reacción múltiple	153
2.1 Prueba en el medio de S.I.M.	153
2.2 Prueba de la leche con tornasol	157
2.3 Prueba de la descarboxilación de la lisina	161
2.4 Prueba en el medio de T.S.I.	164

	Págs.
3. Pruebas complementarias	170
3.1 Prueba de CAMP	170
3.2 Requerimientos de factores X y V	173
3.3 Prueba de la coagulasa	177
D. AISLAMIENTO DE ANAEROBIOS	182
1. Recolección de muestras	182
2. Identificación preliminar de anaerobios por demostración directa	184
3. Medios de cultivo para aislamiento primario	184
4. Métodos y técnicas empleadas para aislamiento de anaerobios	191
4.1 Jarras anaeróbicas	194
a. Jarra de Torbal o Jarra BTL	194
b. Sistema anaeróbico de Gas-Pak	196
c. Jarra de cristal de Brewer	198
4.2 Incubadores anaeróbicos	200
4.3 Otros métodos utilizados para obtener una atmósfera libre de oxígeno	201
a. Utilización de organismos aerobios que absorben el oxígeno	201
b. Método del pirogalol alcalino para cultivo simple	203
c. Inoculación de un medio sólido profundo por picadura	204
d. Utilización de medios PRAS	206
e. Inoculación en el medio de Robertson	207
E. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	210
1. Método de difusión en gelosa	211
2. Método de diluciones de la placa de agar	212
3. Método de dilución en tubos de ensayo	213
4. Otros procedimientos	214
5. Técnicas empleadas para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	214

	Págs.
5.1 Métodos de difusión en disco	214
a. Medios utilizados para la prueba de sensibilidad en disco	215
b. Método de la superposición en el agar	215
c. Método de Bauer-Kirby	219
5.2 Método de dilución en tubo de ensayo	223
 III. MICOLOGIA	 227
 A. MORFOLOGIA BASICA DE LOS HONGOS	 228
1. Estructuras somáticas	229
2. Estructuras reproductoras	231
2.1 Reproducción asexual	231
2.2 Reproducción sexual	236
 B. MICOLOGIA MEDICA VETERINARIA	 241
1. Colección de muestras para la demostración y aislamiento de los hongos patógenos	242
1.1 Micosis exclusivamente tegumentarias	243
1.2 Micosis inicialmente tegumentarias	243
1.3 Micosis secundariamente tegumentarias	243
2. Procedimientos de laboratorio	248
2.1 Tratamiento de las muestras	248
2.2 Examen microscópico directo	252
2.3 Cultivo de los hongos	255
2.4 Método del microcultivo	257
2.5 Técnicas de tinción	261
a. Tinción de azul de algodón lactofenol	261
b. Tinción con azul de algodón acético	263
c. Tinción con ácido peryódico de Schiff	263
d. Tinción de Giemsa	265

	Págs.
3. Micosis exclusivamente tegumentarias	266
3.1 Clasificación	267
3.2 Diagnóstico	269
- Empleo de la lámpara de Wood	269
- Examen microscópico directo	271
- Cultivo	271
- Dermatophyte Test Medium (D.T.M.)	272
4. Micosis inicialmente tegumentarias	279
5. Micosis secundariamente tegumentarias	287
6. Candidosis	295
6.1 Datos clínicos	296
6.2 Diagnóstico	297
- Examen microscópico directo	298
- Cultivo	300
- Prueba del tubo germinativo	300
- Producción de clamidosporas	302
- Zimograma y auxonograma	302
7. Aspergilosis	305
7.1 Datos clínicos	306
7.2 Diagnóstico	307
- Examen microscópico directo	307
- Cultivo	308
BIBLIOGRAFIA	312

I N T R O D U C C I O N

No obstante que las modernas teorías sobre el origen de la vida (la teoría de los Coacervados y la teoría Sulfocianica, de Oparín y Herrera respectivamente), nos muestran que dentro de las primeras formas de vida que poblaron el planeta se encuentran, probablemente -- las bacterias, es hasta fechas muy recientes que el hombre tuvo conocimiento de su existencia.

Hace apenas 300 años que un hombre, con ayuda de un primitivo microscopio de fabricación casera, pudo asomarse por vez primera al - extraordinario mundo de los microorganismos. A partir de ese momento trasendental se fueron sucediendo una larga serie de descubrimientos en el campo de la Microbiología; tiene particular importancia el siglo pasado, ya que en éste es cuando se realizan los primeros avances técnicos en esta ciencia nueva. Para citar algunos --- ejemplos, están los descubrimientos de Pasteur en el campo de los - colorantes y la vacunación antirrábica, Roberto Koch pronuncia sus postulados y reproduce el Carbunco en animales de laboratorio, Hesse descubre que se trabaja mejor en el agar que en la gelatina como superficie para aislar microorganismos; por otro lado, Winogradsky estudia la especificidad de algunas bacterias por un sustrato determinado, permitiendo la identificación de las mismas.

El siglo XX es igualmente importante en cuanto a los adelantos técnicos, ya que en las primeras décadas se descubren los principales antibióticos que empleamos hoy en día, como tratamiento de las enfermedades infecciosas. A nosotros nos corresponde el privilegio -

de ser los herederos de estos conocimientos, y por lo tanto sabemos de la responsabilidad que ello implica y también estamos concientes que nuestros conocimientos actuales, en tiempos futuros, serán obsoletos.

En la actualidad la importancia del Laboratorio en Microbiología -- queda de manifiesto ya que mediante la utilización de técnicas sencillas podemos facilmente establecer un diagnóstico confiable de -- las enfermedades infecciosas en el hombre y los animales.

Este Manual se realizó con el objeto de llenar la necesidad de contar con una fuente de información accesible y consisa sobre las técnicas y procedimientos prácticos del laboratorio en Bacteriología y Micología Médica Veterinaria. La forma de presentación ilustrada -- está pensada de manera que sea útil tanto al Veterinario en ejercicio como al estudiante de Medicina Veterinaria. Esperamos que el -- presente trabajo sea igualmente útil para los laboratoristas, profesores, y en general para todas aquellas personas relacionadas con -- el campo de la Microbiología.

En el capítulo I se describen los métodos de campo y los procedimientos para obtener, preservar, y remitir las muestras para su análisis en el laboratorio.

El capítulo II está estructurado según los principios fundamentales del Diagnóstico Microbiológico que son: Demostración, Aislamiento e

Identificación. En base a lo anterior se incluyen algunas de las - pruebas y métodos de uso rutinario que se utilizan en el laborato-- rio de Bacteriología, para terminar con las pruebas de sensibilidad antimicrobiana más comunes y de esta manera tener los elementos ne- cesarios para poder establecer un esquema terapéutico de las enfer- medades causadas por bacterias.

Por último, en el capítulo III, se hace una introducción a los cam- pos fundamentales de la Micología Médica, y aplicando los mismos -- principios del Diagnóstico Microbiológico; se describen los procedi- mientos para manejar especímenes en este campo. También se inclu- yen las técnicas más usuales para el aislamiento, demostración y la identificación de los hongos que afectan a los animales útiles al hombre.

En esta reseña introductoria deseamos mostrar nuestro agradecimiento MVZ Gilberto Ochoa Uribe y al Dr. Roberto A. Cervantes, por su apor- tación de ideas y por su crítica al manuscrito original. Asimismo, agradecemos al MVZ Tonatiuth Cruz Sánchez, y al MVZ Luz Ma. Ortega de O., por su colaboración y facilidades que nos brindaron durante la recopilación bibliografía.

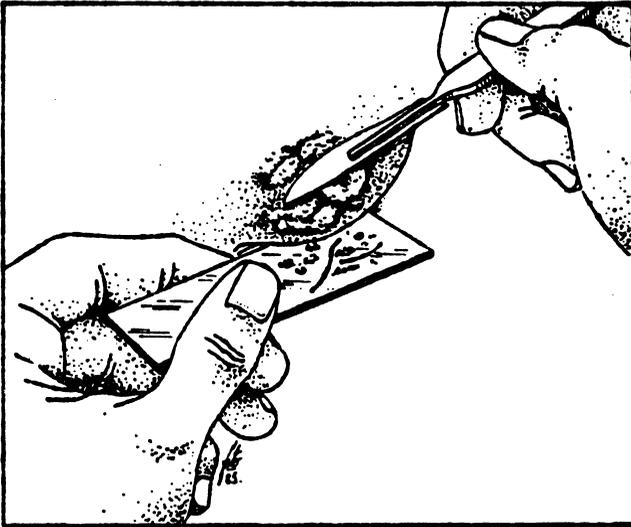
Deseamos mostrar nuestro agradecimiento de manera especial al Lic. Gerardo A. Hernández Ponce, por la ordenación temática y a la Srita. Florina Lucía Castillo P., por la labor mecanográfica, sin la cual el presente trabajo no hubiese sido posible.

OBJETIVOS

1. Elaborar un Manual, el cual, cumpla con la función de libro de trabajo, para laboratorio, en las asignaturas de Bacteriología y Micología Médica Veterinaria.
2. Mostrar en forma ilustrativa las técnicas y procedimientos de laboratorio más comúnmente utilizadas.
3. Hacer llegar este Manual, en primer lugar, al estudiante de Medicina Veterinaria, al Médico Veterinario Clínico y a los profesionistas afines al área. Sirviendo éste, como material de apoyo en su formación y su ejercicio profesional.

CAPITULO I

RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS



CAPITULO I

RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS

El laboratorio de diagnóstico es un auxiliar en el reconocimiento de las enfermedades de los animales, el Médico clínico en ejercicio tiene necesidad, con frecuencia, de consultar los laboratorios comerciales u oficiales para poder proporcionar un diagnóstico acertado. Pero para obtener los resultados esperados es esencial que las muestras enviadas para el examen sean remitidas de una manera adecuada¹⁷.

Los resultados que arrojan estos análisis dependen de la naturaleza de la muestra del cuidado con que sea tomada, del tiempo de recolección, de la eficiencia técnica del personal que realiza los exámenes de laboratorio, del criterio con que sea tomada y de la adecuada selección de la muestra.

El tipo de muestra que deberá examinarse está determinada por el cuadro clínico inicial. Si los signos o síntomas señalan afección de un órgano o sistema específico, las muestras deberán obtenerse de tal fuente. Si las lesiones a la necropsia sugieren la presencia de un agente bacteriano o micótico, las muestras a tomar se limitarán exclusivamente a los órganos afectados y no a los de apariencia normal, ya que de lo contrario se trabajarán muestras inadecuadas que encarecerán los costos de transporte, aumentando los gastos de materiales pudiendo llegar a dificultar el diagnóstico de laboratorio⁴⁹.

En la recolección y envío de muestras, es recomendable observar los siguientes pasos:

a) La muestra seleccionada para el laboratorio debe ser representativa del proceso infeccioso en cuestión. Se recomienda de ser posible, tomar la muestra

de un animal sano, así como de otro que manifieste el cuadro clínico y una más, de ser posible, de un animal que se encuentre en un estado avanzado de la enfermedad, pudiéndose sacrificar para tomar las muestras en caso de que no se disponga de animales recientemente muertos o que no se pueda tomar las muestras de los animales vivos.

Suele ser mejor remitir varias muestras del mismo lugar, esto es aconsejable sobre todo, en brotes epizooticos en aves de corral, lechones u otros animales cuyo costo por unidad es bajo^B.

b) Deberá ser una cantidad suficiente a fin de lograr un estudio lo más completo posible.

c) Tomar las muestras con valor confirmativo antes de la administración de cualquier medicamento.

d) Emplear material estéril y tomar la muestra con asepsia a fin de no contaminar el producto durante su recolección.

e) Evitar la desecación de la muestra, empleando medios de transporte adecuados (medio de transporte de Stuart, caldo nutritivo, medio de Tioglicolato, etc.) para su traslado al laboratorio.

f) Si el animal no muestra signos o síntomas de infección localizada, deberán tomarse muestras seriadas de sangre para su cultivo, posteriormente se tomarán muestras de otros sitios anatómicos, según la opinión y criterio clínico del Médico, por ejemplo urocultivos.

g) Si el germen (a veces gérmenes) aislado proviene de una región estéril se podrá considerar como el agente etiológico de la infección, por ejemplo, sangre, líquido cefalo raquídeo, líquido pleural y sinovial; por el contrario, la recuperación de un microorganismo patógeno o potencialmente patógeno, pero proveniente de zonas del cuerpo que normalmente albergan una flora bacteriana mixta, como son el tracto génito-urinario, tracto gastrointestinal y heridas de la piel, deberá

de ser considerado dicho germen, como saprófito, siempre y cuando no se trate de microorganismos de patogenicidad definitivamente establecida, tales como salmonelas, shigelas, E. coli enteropatógenas, aisladas sobre todo en los coprocultivos⁸.

h) Por último, las muestras deberán ser remitidas al laboratorio y solicitar el diagnóstico a la mayor brevedad posible, generalmente se requieren muestras con no más de 24 horas, a menos que el conservador utilizado sea confiable.

En la recolección de todo tipo de muestras, el instrumental empleado debe esterilizarse previamente utilizando la flama directa, la ebullición o el vapor según sea su naturaleza. El material que será utilizado para el envío de las muestras debe presentar también condiciones estériles, de no contar con un sistema adecuado de esterilización, se recomienda hervir todos los recipientes (frascos, tubos, etc.) durante 20 minutos¹⁷.

El resultado obtenido en el laboratorio es muy valioso para el diagnóstico y depende de muchos factores, la mayoría de ellos son de la absoluta responsabilidad del Médico de campo, quien en ocasiones inculpa al laboratorio al no obtener los resultados esperados. El envío de las muestras, manejadas, seleccionadas y preservadas inadecuadamente, sólo ocasionan pérdidas de tiempo para el Médico Veterinario y el personal de laboratorio.

El Médico Veterinario de campo debe ser competente para realizar algunas técnicas sencillas que le permitan verificar el diagnóstico rápido y seguro de una enfermedad infecciosa, debe de conocer con seguridad cómo, cuándo y dónde tomar la muestra, qué exámenes se deben llevar a cabo en el laboratorio, así como de interpretar y correlacionar los resultados de dichos análisis⁴⁹.

A. RECOLECCION DE ORGANOS Y TEJIDOS

La toma de órganos y tejidos se realiza al momento de la necropsia. Las muestras destinadas para estudio bacteriológico deben ser tomadas con precaución y como máximo una hora después de la muerte del animal. Las muestras de elección serán vísceras como hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, cerebro e intestino, dependiendo del proceso infeccioso que se trate (Ver Cuadro 1.1). En animales pequeños se recomienda conservar el órgano completo, mientras que en animales grandes se tomará un fragmento significativo que incluya la lesión³⁷.

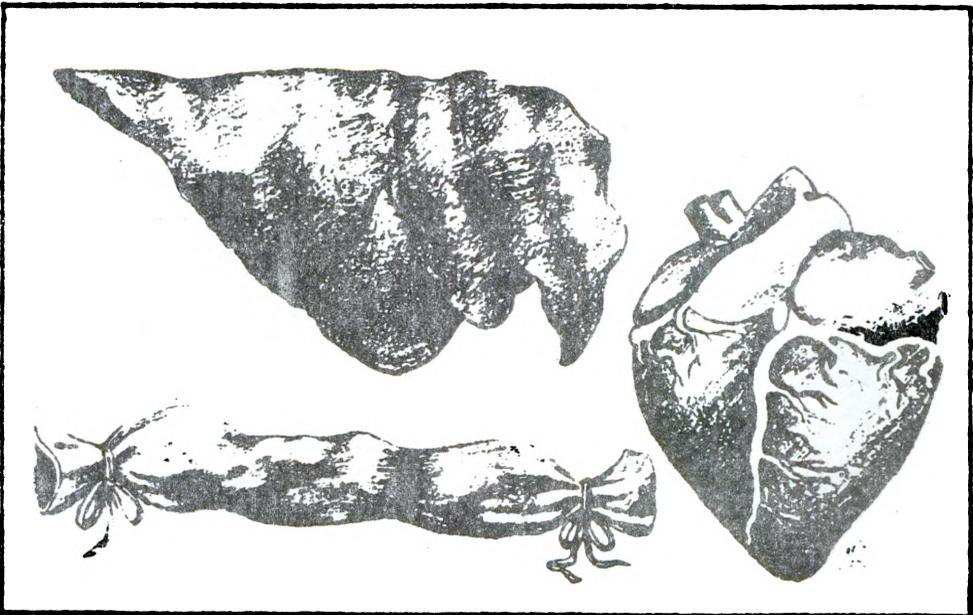


Fig. 1.1 Muestras de elección para el caso de órganos y tejidos.

Algunas ocasiones, la muestra debe ser "sellada" flameándola directamente o utilizando una espátula previamente flameada, para luego depositarlas en frascos individuales previamente esterilizados o hervidos, se prefieren frascos de boca ancha para facilitar el manejo de este tipo de muestras (Ver Fig. 1.2).

CUADRO 1.1

TIPO DE ENFERMEDAD Y ORGANOS A ENVIAR.

ENFERMEDAD	MUESTRA
Abomasitis	Animal entero, abomaso
Aborto	Placenta
Artritis	Animal entero vivo
Aspergilosis	Animal entero, órgano afectado, pulmones
Brucelosis	Abomaso y pulmones de feto
Candidosis	Animal entero, placenta
Carbunco	Animal entero, músculo
Cólera aviar	Animal entero, hígado, pulmón, bazo e intestino
Colibacilosis	Animal entero, intestino delgado, bazo, ganglios linfáticos
Coriza	Animal entero, órganos afectados
Criptococosis	Animal entero, pulmón, hígado, riñón
Desintaría	Animal entero y vivo
Edema intestinal del cerdo	Animal entero, encéfalo, intestino, ganglios linfáticos
Edema maligno y pierna negra	Animal entero
Enfermedad de Glasser	Animal entero
Enterotoxemia	Asa intestinal y tejidos afectados
Enfermedad crónica respiratoria	Animal entero, órganos afectados
Erisipela	Animal entero, bazo, hígado, riñón, toncillas, ganglios linfáticos
Espiroquetosis	Animal entero, bazo, hígado
Epidermitis	Animal entero, piel, riñón

CONTINUACION DEL CUADRO 1.1

ENFERMEDAD	MUESTRA
Gurra	Ganglios linfáticos
Hemoglobinuria bacilar	Hígado
Listeriosis	Placenta, encéfalo, médula
Paratuberculosis	Animal entero, ganglios linfáticos mesen- téricos, cólicos y rectales
Pasteurelosis	Ganglios linfáticos, pulmones
Rinitis	Cerdo entero vivo, trompa
Salmonelosis	Animal entero, intestino, hígado, riñón, bazo, pulmón
Shigelosis	Animal entero, intestino, hígado, bazo, pulmón
Tuberculosis	Tejidos afectados
Tularemia	Animal entero, hígado y órganos afectados
Vibriosis	Placenta

FUENTE:

Elaborado en base al cuadro 1.8

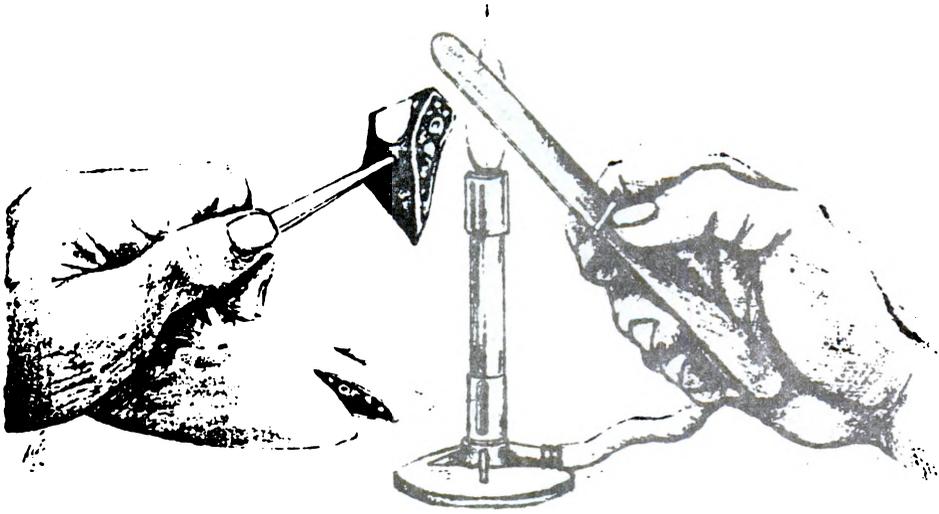


Fig. 1.2 "Sellado" de una muestra de órgano.

Cuando no se cuenta con un adecuado sistema de refrigeración y se desea un estudio bacteriológico, se puede emplear una solución estéril de glicerina y agua al 50%, la cual retarda la descomposición de las muestras²³.

En general, para el envío de una muestra al laboratorio de diagnóstico es importante considerar 3 puntos básicos que son:

1. Identificación de la muestra
2. Historia clínica y
3. Método de conservación

1. La identificación de la muestra es de primordial importancia para el laboratorio, y debe consistir en lo siguiente:

- Nombre del propietario o cliente
- Descripción de los animales
- Fecha y hora de muerte, así como de la toma de la muestra
- Nombre o número del animal, si es de un hato o de manada (Ver Fig. 1.3).

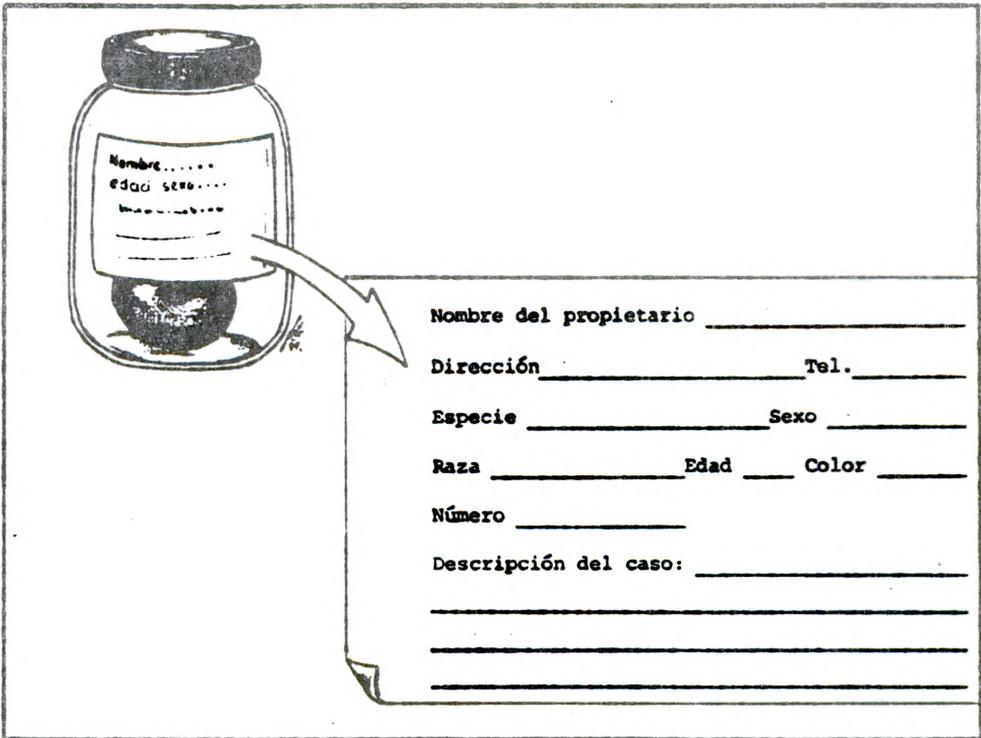


Fig. 1.3 Aspecto de la identificación de las muestras enviadas al laboratorio de diagnóstico.

2. Es necesario incluir una historia clínica adecuada y no omitir detalles tales como:
 - Curso de la enfermedad
 - Número de animales afectados
 - Índice de morbilidad y mortalidad
 - Edad de los animales afectados
 - Tipo de alimento (cantidad y calidad)
 - Tipo de explotación (estabulación, semiestabulación, libre pastoreo, etc.)

- Sintomatología general
- Sintomatología individual
- Calendario de vacunación
- Tratamientos aplicados, indicando si hubo o no respuestas favorables a los mismos
- Tipo de conservador usado en la muestra antes y durante su empaque
- Y de ser posible, el diagnóstico presuncional emitido por el Médico Veterinario Zootecnista¹⁷.

3. Como medio ideal de conservación se recomienda la refrigeración, ya sea con hielo natural o hielo seco, pero siempre y cuando dichas muestras sean debidamente empacadas.

Para el envío de las muestras a un laboratorio de diagnóstico, siempre debe de tenerse en cuenta que los materiales son potencialmente infecciosos, por lo que el medio más eficaz y seguro para el envío de muestras es el mensajero directo; pero en algunas ocasiones se requiere del servicio postal, cuando esto último se usa, las muestras deben de reunir los siguientes requisitos:

- Deben de estar colocadas en recipientes dobles (dos cajas o bien una caja y bolsas de plástico) ya que se mejora el aislamiento y aumenta la resistencia del recipiente³⁷.
- Como se mencionó anteriormente, las muestras deberán de ser enviadas en recipientes individuales, entre cada bolsa o frascos que contengan las muestras se coloca un material que amortigue los golpes y absorba la humedad (se prefiere el aserrín, pero puede utilizarse papel o viruta) (Ver Fig. 1.4), la caja externa se cierra de tal forma que todas las esquinas y tapas queden selladas con cinta adhesiva; esto a su vez aumenta la resistencia del recipiente. Es muy importante que en la envoltura de los paquetes sean puestos con claridad los siguientes datos: MATERIAL DE FANIL DESCOMPOSICION PARA ANALISIS, MANEJESE CON CUIDADO, FRAGIL. (Ver Fig. 1.5).

Fig. 1.4 Método para empacar muestras utilizando hielo natural como conservador.

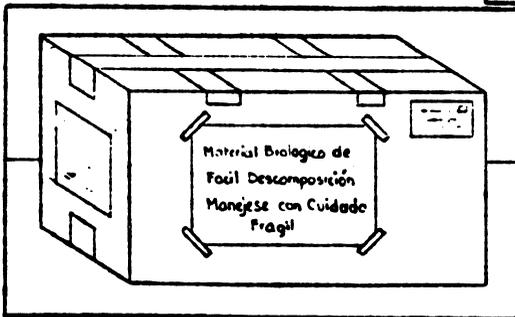
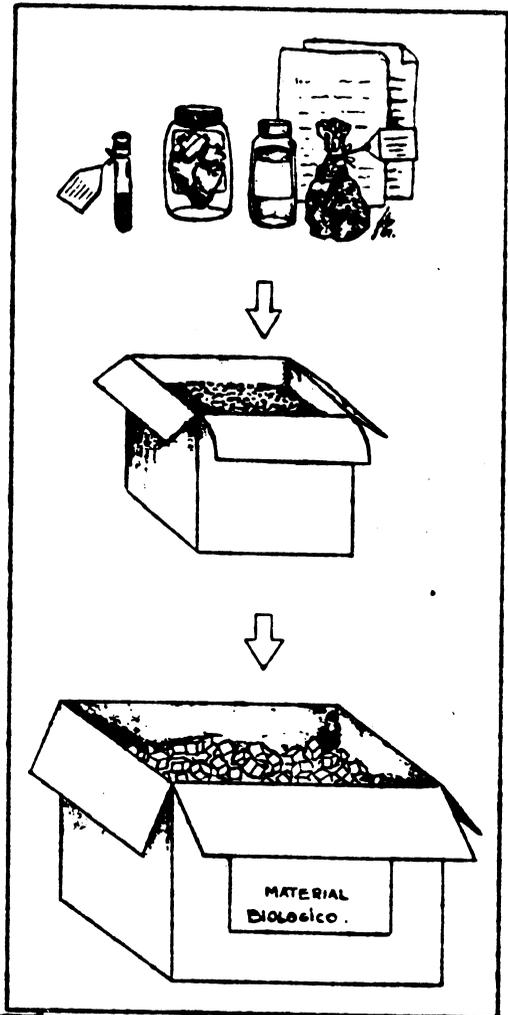


Fig. 1.5 Muestra lista para ser enviada. Cada paquete debe incluir, su respectiva hoja clínica.

Con el fin de que el material biológico llegue lo más pronto posible al laboratorio, deberá considerarse la conveniencia de la forma de envío (área o por carretera, ya sea por flete en líneas comerciales o vehículos particulares), además al remitir la muestra, es conveniente comunicarse inmediatamente al laboratorio, indicando el medio de transporte, línea comercial empleada y hora probable de arribo a su destino, así como el número de gufa sanitaria.

No es recomendable enviar muestras a los laboratorios de diagnóstico los fines de semana, períodos cercanos a vacaciones, días festivos, ya que se corre el peligro de que éstas no sean recibidas.

B. RECOLECCION DE SANGRE

1. Recolección de sangre completa

Las muestras de sangre completa son remitidas al laboratorio, en todos aquellos casos en los que el proceso infeccioso cursen los signos como hematuria, hemoglobinuria, ictericia, o bien se sospeche de una septicemia³⁸ (Ver cuadro 1.2).

En la práctica veterinaria los exámenes hematológicos se realizan más satisfactoriamente con la sangre venosa. La punción venosa, mediante aguja y jeringa estériles, se realiza en cualquiera de las venas superficiales prominentes, por ejemplo, en el caballo, la vaca, la oveja y la cabra, la vena de elección es la vena yugular. Las venas radial y/o safena puede elegirse en el gato y en el perro (Ver Fig. 1.6). La longitud y el calibre de las agujas utilizadas debe ser proporcional al tamaño del sujeto¹⁷. (Ver cuadro 1.3).

CUADRO 1.2

TIPO DE ENFERMEDAD Y MUESTRA SANGUINEA

Abomasitis por clostridium	Sangre
Aborto	Suero de la madre
Antrax	Función de oreja, sangre, frotis sanguíneo
Botulismo	Sangre
Candidosis	Sangre
Colibacilosis	Sangre
Criptococosis	Sangre
Enfermedad de Glasser	Suero
Enfermedad crónica respiratoria	Suero
Erisipela	Sangre y suero, frotis sanguíneo
Espiroquetosis aviar	Frotis sanguíneo
Hemoglobinuria bacilar	Sangre
Leptospirosis	Suero, sangre
Listeriosis	Suero
Muermo	Suero
Paratuberculosis	Suero
Tétanos	Suero
Tuberculosis	Suero
Tularemia	Suero
Vibriosis	Suero

FUENTE: Elaborado en base al cuadro 1.8

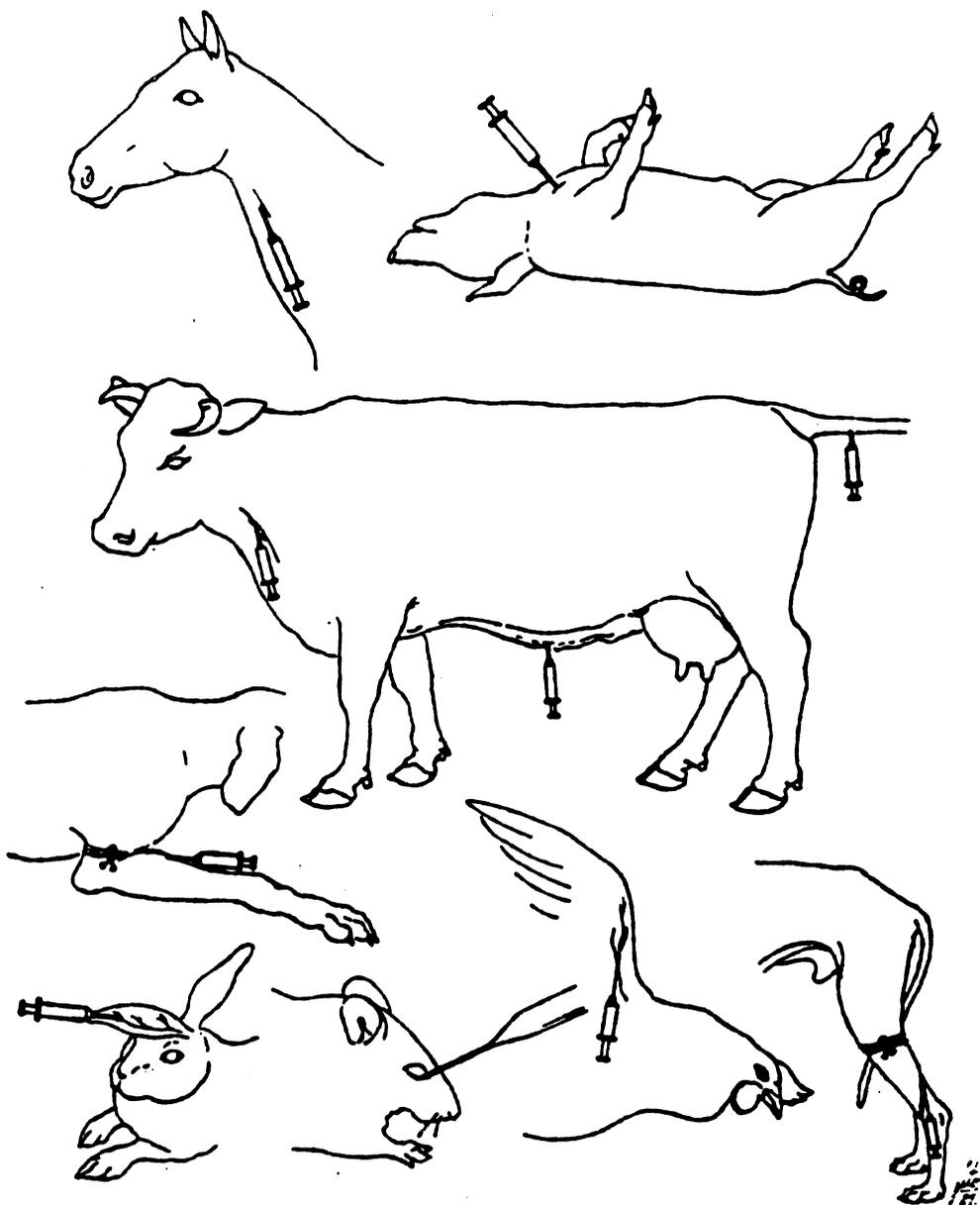


Fig. 1.6 Vías de sangrado utilizadas en los animales domésticos.

CUADRO 1.3

OBTENCION DE LA MUESTRA SANGUINEA

ESPECIE.	SITIO	TAMAÑO DE LA AGUJA	
		Calibre	Long. (Pulgs.)
Equino	Vena Yugular	14 - 18	2.5 - 3.0
Bovino	Vena yugular, coxígea ventral subcutánea abdominal	14 - 18	2.5 - 3.0
Ovino	Vena yugular	16 - 18	2.5 - 3.0
Caprino	Vena yugular	16 - 18	2.5 - 3.0
Porcino	Vena cava anterior o auricular	19 - 21	1.5 - 4.0
Canino	Vena cefálica o safena	20 - 22	1.5
Felino	Vena cefálica o safena	20 - 25	1.0
Conejo	Punción cardíaca, vena yugular, vena auricular	19 - 23	2.0
Hamster	Punción cardíaca, seno retro- orbitario	22 - 25	1.5
Cuyes	Punción cardíaca, seno retro- orbitario	22 - 25	1.5
Ratón	Corte del apéndice caudal seno retroorbitario	27 o tubo capilar	1.0
Rata	Punción cardíaca, seno retro- orbitario	25 - 27	1.0
Ave	Punción cardíaca, vena radial	21 - 27	1.0

FUENTE: Keilbach, 1983

Para su recolección se recomienda la técnica aséptica descrita a continuación:^{34,44}

- Rasurar y lavar la zona
- Ligar y localizar la vena
- Desinfectar con yodo y luego con alcohol al 70%
- Dejando secar piel y evitando volver a tocar la zona, puncionar con jeringa estéril, usando la aguja adecuada para cada especie (Ver cuadro 1.3). La cantidad de sangre varía, y se obtienen no menos de 5 ml en pequeñas especies y 10 ml en grandes especies.
- Incluir la sangre en un tubo estéril con anticoagulante, se prefiere el polyanetosulfonato de sodio (SPS) al 0.05 - 0.025 por ciento. El oxalato, citrato y E.D.T.A no se recomiendan por inhibir a los microorganismos¹⁹.

Para evitar la hemólisis se deberán tomar ciertas precauciones: la aguja y jeringas deben estar estériles y secos, la sangre debe fluir libremente en la jeringa, ejerciendo la menor aspiración posible con el émbolo. Antes de pasar la sangre de la jeringa al tubo debe quitarse la aguja, al vaciar esta sangre debe de resbalar por las paredes del tubo y no caer directamente al fondo. Una vez que se tiene la sangre en el tubo, este se invertirá suavemente una docena de veces para homogenizar de una manera adecuada la sangre con el anticoagulante (Ver Fig. 1.7), la muestra se envía inmediatamente al laboratorio identificada y en refrigeración³⁷.

2. Obtención de suero sanguíneo

Para la obtención de suero sanguíneo, se recomienda que la sangre debe tomarse directamente en un tubo estéril sin ningún preservativo, y en cantidad de 10-20 ml, dependiendo la especie, no se debe sangrar en recipientes de plástico ya que el suero no se separa del coágulo satisfactoriamente¹⁷.

La técnica de muestreo es similar a la de la sangre, es importante dejar deslizar lentamente la sangre en la pared del tubo evitando la hemólisis; en el campo, los

tubos con la muestra se dejan a temperatura ambiente e inclinados hasta formarse el coágulo; una vez formado éste, se colocan en refrigeración para su envío.

Cuando la muestra puede ser llevada de inmediato al laboratorio, se centrifuga a 2500 rpm durante 10' removiéndose cuidadosamente el suero con el fin de eliminar los glóbulos rojos que forman un paquete en el fondo del tubo (Ver Fig. 1.8)

Una vez que los tubos han sido identificados y sellados, deberán colocarse en una bolsa de plástico que luego se guarda en congelación o refrigeración hasta el momento de su entrega al laboratorio³⁴.

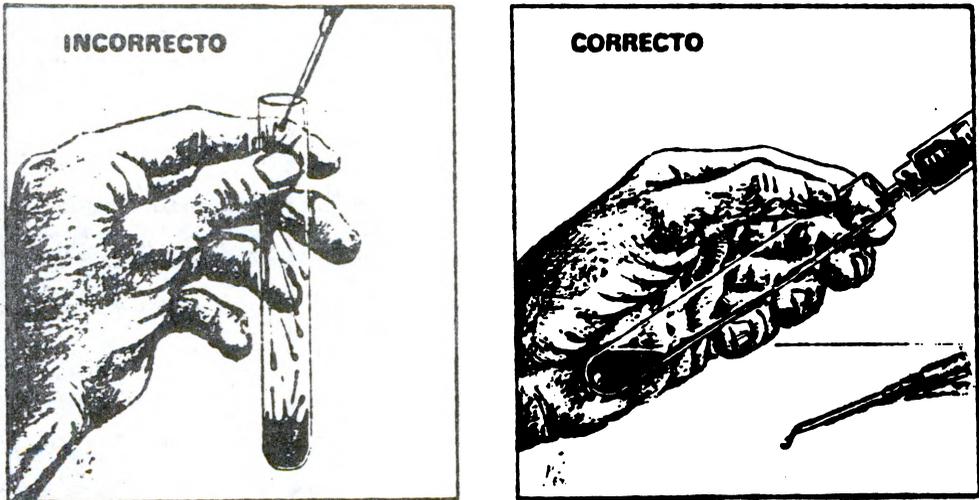


Fig. 1.7 Manera correcta de depositar una muestra de sangre para su envío al laboratorio de diagnóstico. Nótese la forma incorrecta al introducir la al tubo de ensayo.

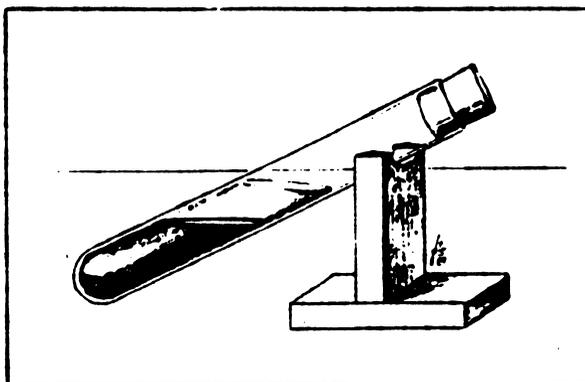


Fig. 1. 8 Método adecuado para la separación del coágulo y obtención de suero sanguíneo.

C. RECOLECCION DE ORINA

El análisis de orina es uno de los procedimientos de laboratorio más comunes aplicados a la práctica veterinaria, es de gran ayuda para el diagnóstico y deferencia ción de padecimientos generalizados como la septicemia y localizados del aparato genitourinario³⁸ (Ver cuadro 1.4).

La muestra de orina puede obtenerse por dos métodos comunmente usados: en un recipiente estéril durante la micción espontánea o bien por medio del sondeo vesical en la mayoría de las especies. Las muestras obtenidas por este último método son preferibles para estudios más exactos ya que están libres de detritus uretrales o vaginales.

Las yeguas, vacas y perras y se pueden cateterizar con relativa facilidad, en todos los casos se deben emplear instrumentos estériles, junto con un apropiado espéculo en el caso de la yegua y perra¹⁷ (Ver Fig. 1.9), es conveniente sondear al animal sin provocarle dolor o traumatismo que pueda producirle alguna infección.

En animales pequeños, la muestra se obtienen por punción de la vejiga en condiciones absolutamente estériles, y auxiliados por una persona capacitada en el manejo del animal (Ver Fig. 1.10).



Fig. 1.9 Método apropiado para la obtención de orina en perras.



Fig. 1.10 Punción vesical en conejos

Por micción espontánea, las muestras se obtienen satisfactoriamente del toro, del carnero y del macho cabrío por el método descrito por Besson (1943), que emplea un bolsa hembra de hule o caucho que es atada al animal, de tal forma que su abertura está yuxtapuesta al orificio prepucial (Ver Fig. 1.11), el aparato consta de un arnés que pasa entre los cuartos anteriores y posteriores¹⁷.

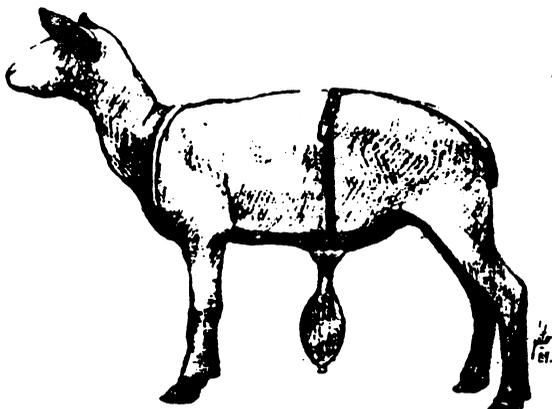


Fig. 1.11 Método para obtener la muestra de orina en un carnero utilizando un urinal de hule para hembra aplicado al prepucio (Besson y col., 1943).

Otros métodos prácticos utilizados en la obtención de orina en las pequeñas especies, son: 1) ejercer presión sobre la vejiga urinaria hasta lograr que fluya esta última, en los perros y gatos; y 2) la utilización de cajas de recolección limpias.

Para todos los métodos, deben de recogerse un mínimo de 120 cc, y ser depositados en un recipiente estéril, el cual es remitido al laboratorio de diagnóstico lo más rápido posible y en refrigeración.

Cuando se requiera tomar una muestra de un animal durante la necropsia, ésta deberá obtenerse directamente de la vejiga tratando de evitar el contacto con otras

vísceras o líquidos corporales, utilizando una aguja y jeringa estéril³⁷.

Debido a que el diagnóstico de la bacteriuria depende del análisis cuantitativo, es muy importante que la toma, la conservación y el envío de la muestra se realice de manera adecuada y con cuidados extremos, ya que las bacterias contaminantes pueden multiplicarse a la temperatura ambiente e invalidar completamente los resultados del análisis bacteriológico. Si la muestra no puede ser analizada dentro de las primeras 2 horas de colectada debe refrigerarse inmediatamente; de esta manera la cuenta bacteriana permanecerá estable durante 24 horas por lo menos⁴⁰.

CUADRO 1.4

TIPO DE ENFERMEDAD Y MUESTRA DE ORINA

ENFERMEDAD	MUESTRA
Candidosis	Orina
Criptococosis	Orina
Hemoglobinuria bacilar	Orina
Leptospirosis	Orina
Listeriosis	Orina
Pielonefritis	Orina

FUENTE: Elaborado en base al cuadro 1.8

D. RECOLECCION DE LECHE

Las muestras de leche son obtenidas y remitidas al laboratorio para demostrar de manera específica a los agentes etiológicos involucrados en los cuadros de mastitis. La muestra se deberá recoger después de depilar, lavar y secar la ubre, sin eliminar los primeros chorros de leche, ya que éstos contienen mayor número de microorganismos infectantes. Utilizando un escobillón de algodón humedecido con una solución yodada o con alcohol al 70%, se desinfecta el extremo del pezón, dejando secar, la leche se obtiene ordeñando la cantidad necesaria y utilizando frascos estériles⁴⁹ (Ver Fig. 1.12).

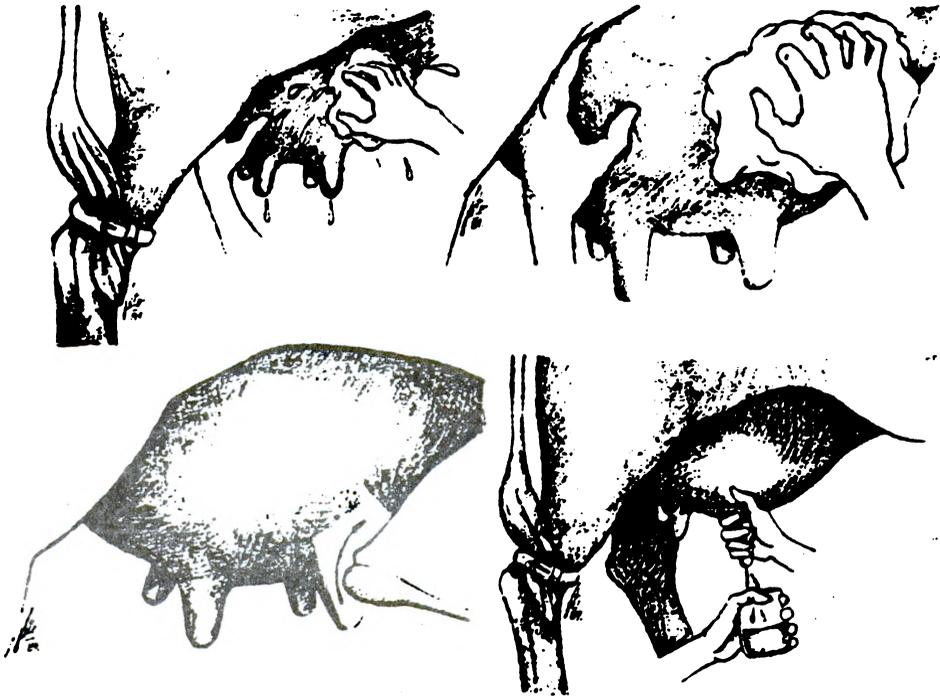


Fig. 1.12 Técnica utilizada para obtener una adecuada muestra de leche en bovinos.

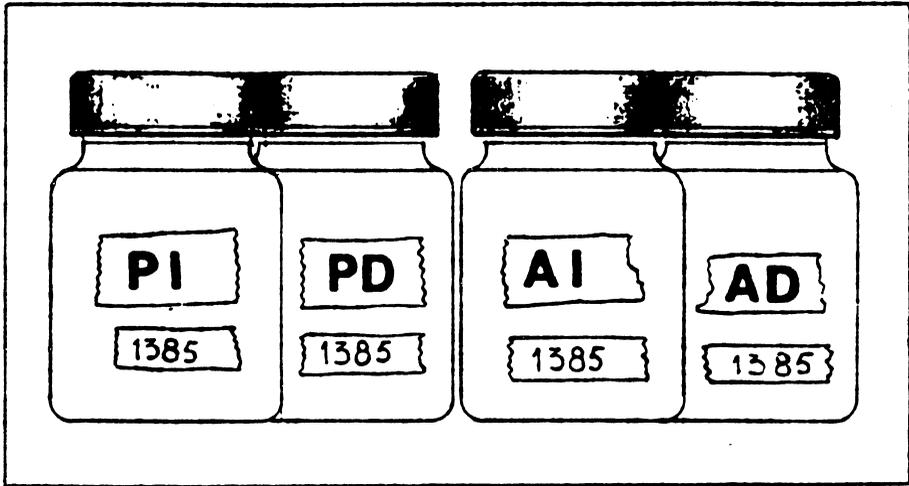


Fig. 1.13 Muestras individuales ya identificadas, que serán remitidas al laboratorio de diagnóstico.

La muestra deberá ser tomada en un frasco estéril con tapón de rosca con capacidad de por lo menos 20 ml, evitando el contacto entre el frasco y el pezón, la muestra puede ser tomada por otra persona para que el clínico pueda proteger la boca del frasco con la tapa y mantenerlo inclinado, evitando así la contaminación con bacterias del medio ambiente¹⁷.

Generalmente, se recogen de 15 a 20 ml de cada cuarto afectado, las muestras se toman en el orden siguiente: cuartos posterior izquierdo (PI), anterior izquierdo (AI), posterior derecho y anterior derecho. Los frascos son identificados individualmente con el número del animal (Ver Fig. 1.13), y enviados en refrigeración utilizando el método descrito anteriormente³⁸.

Es importante que el área de muestreo esté libre de corrientes de aire y que los operadores laven sus manos en una solución desinfectante entre las tomas efectuadas en cada animal.

E. RECOLECCION DE MUESTRAS DE HERIDAS ABIERTAS, ABSCESOS Y EXUDADOS.

Cuando en las manifestaciones clínicas se presentan secreciones o exudados las muestras de estas sustancias pueden ser de valor diagnóstico tal es el caso de Gonorrea, Queratoconjuntivitis, Linfadenitis caseosa, etc., (Ver cuadro 1.5).

En heridas abiertas o abscesos, lo mismo que para frotis de garganta y otros exudados, los hisopos de algodón previamente esterilizados en tubos de ensayo, son los que ofrecen las mayores ventajas⁴⁹. A menudo es difícil recobrar el agente causal en una herida pues ella contiene muchos gérmenes contaminantes; por lo tanto se debe proceder a la limpieza previa de la herida antes de la toma de la muestra⁴⁴.

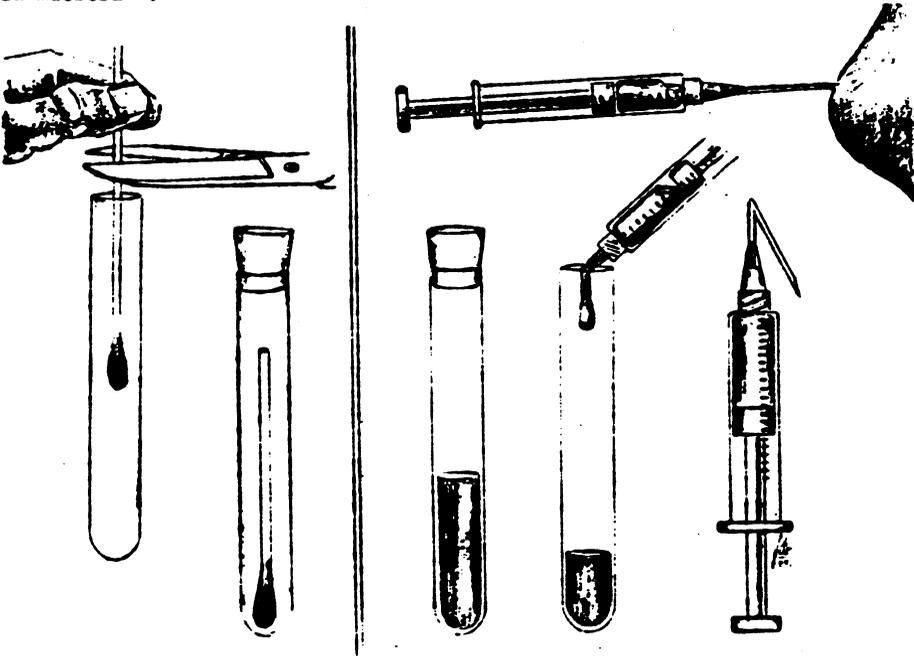


Fig. 1.14 Métodos utilizados para la recolección y envío de muestras cuando el material requerido son hisopos o jeringas estériles

CUADRO 1. 5

TIPO DE ENFERMEDAD Y MUESTRA DE HERIDAS, EXUDADOS Y ABSCESOS

ENFERMEDAD	MUESTRA
Absceso	Exudado
Actinobacilosis y Actinomicosis	Biopsia, exudado
Antrax	Líquido de edema
Artritis	Líquido articular
Brucelosis	Exudado vaginal
Coriza	Exudado
Edema maligno y pierna negra	Líquido de edema
Erisipela	Exudado articular
Gurma	Secreción nasal
Linfadenitis	Exudado
Muermo	Secreciones
Pasteurelisis	Secreción nasal
Queratoconjuntivitis	Exudado conjuntival
Rinitis	Exudado nasal
Tuberculosis	Secreciones, esputo
Vibriosis	Moco vaginal

FUENTE:

Elaborado en base al cuadro 1. 8

Una vez tomada la muestra se procesa inmediatamente, pero si ello no es posible, se debe evitar que se seque colocándola en un tubo estéril con 2 o 3 ml de caldo nutritivo o medio de transporte Stuart, rompiendo el mango para eliminar la parte que ha estado en contacto con las manos (Ver Fig. 1.14).

En algunas ocasiones se requiere realizar exámenes de abscesos, edemas y hematomas, para obtener este tipo de muestras, está indicado el empleo de punciones, la técnica de punción varía según el sitio donde se toma la muestra, para todos los casos, el sitio de la piel donde se va a realizar la punción se debe lavar y desinfectar, las agujas y jeringas deben de estar secas y estériles, lo mismo que los tubos o frascos empleados para recolectar la muestra, cuando la muestra no puede ser aspirada por lo denso del material, se puede inyectar en el sitio, solución salina o caldo nutritivo estéril ⁴⁹ (Ver Fig. 1.14).

En el caso de muestras líquidas de cavidades articulares, el procedimiento es similar, y el mínimo de muestra requerido es de 1 cc; la muestra se obtiene con jeringa estéril y aguja de calibre variable, dependiendo la especie animal (Ver Fig. 1.15). El líquido obtenido, se envía al laboratorio en la misma jeringa o bien en un tubo de ensayo estéril.

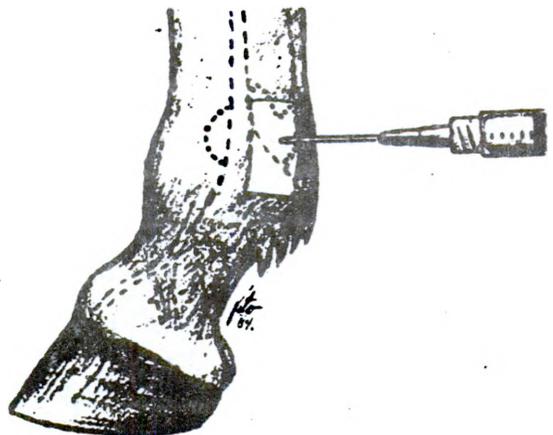


Fig. 1.15 Punción de la articulación del menudillo en un equino

F. RECOLECCION DE LIQUIDO CEFALORAQUIDEO

Los microorganismos relacionados con los padecimientos del Sistema Nervioso Central. (Por ejemplo, Cryptococcus neoformans), pueden ser demostrados mediante el examen directo del líquido cefaloraquídeo (Ver cuadro 1.1).

La muestra se puede obtener de la cisterna magna o del espacio subaracnoideo espinal en la región lumbar, independientemente del lugar utilizado se requiere de una adecuada aguja espinal con su estilete en posición, pues de otra manera se

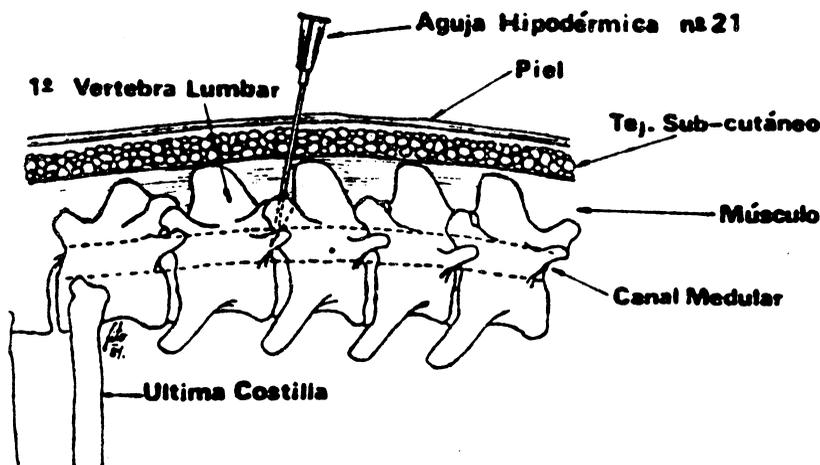


Fig. 1.16 Punción lumbar

puede taponar con grasa u otro tejido⁴⁴.

Es indispensable tomar estrictas medidas de asepsia en el área elegida para la punción, cuando se realiza la punción de la cisterna magna, se recomienda la anestesia general, mientras que la anestesia local puede ser suficiente en el caso de la punción lumbar.

Cuando se utiliza la región lumbar, el animal se coloca en posición esternal con la cabeza en el extremo más alto de la mesa inclinada formando un ángulo de 75°

con el objeto de acumular en el área lumbar la máxima cantidad de líquido (Ver Fig. 1.16), usualmente se colectan de 2 a 5 ml utilizando tubos estériles para su envío al laboratorio³⁸.

G. RECOLECCION DE HECES

La recolección de heces se hace indispensable para la determinación de los microorganismos causantes de problemas gastro-entéricos en todas las especies (Ver cuadro 1.6).

La muestra debe de ser fresca y estar libre de piedras, tierra y paja, lo más recomendable es obtener la muestra directamente del recto utilizando un guante plástico, tan pronto como la cantidad de heces sea suficiente, el guante es reversed hacia adentro, y de esta forma sirve como recipiente de recolección, se cierra cuidadosamente y se identifica para su envío al laboratorio¹⁷ (Ver Fig. 1.17).

En las pequeñas especies se recomienda el uso de hisopos, los cuales son enviados en un tubo de ensayo que contenga algún medio de transporte (caldo de BHI, tioglicolato, etc.) para evitar su desecación⁵³.

Las muestras se envían refrigeradas en un volumen no menor de 1 gr. utilizando



Fig. 1.17 Utilización del guante de palpación en la toma y envío de heces

recipientes limpios, que pueden ser pequeños frascos de vidrio de cerca de 1/4 de litro, o bien cajas de cartón encerado con tapas herméticas.

CUADRO 1.6

TIPO DE ENFERMEDAD Y MUESTRA DE HECES

ENFERMEDAD	MUESTRA
Colibacilosis	Heces
Disenteria	Heces
Edema intestinal del cerdo	Heces
Enterotoxemia	Asa intestinal, heces
Listeriosis	Heces
Paratuberculosis	Heces
Salmonelosis	Heces
Shigelosis	Heces

H. RECOLECCION DE SEMEN

El semen es requerido cuando se sospecha de problemas de infertilidad en el macho, tal es el caso de la Brucelosis, entre otras causas, que provoca pérdidas por este motivo.

Una muestra de semen se puede obtener por tres métodos: vagina artificial, estimulación de órganos sexuales accesorios y por último por el empleo del electro

eyaculador.

El método más usual es el de la vagina artificial, ya que nos ofrece la ventaja de poder recoger la totalidad del líquido eyaculado en forma natural y además evitar la contaminación accidental (Ver Fig. 1.18).

La estimulación de órganos sexuales accesorios, se realiza por palpación rectal estimulando la próstata, vesículas seminales y la raíz del pene¹⁷.

La manipulación manual de los genitales externos, es la técnica recomendada para la obtención del semen en el perro, en el cerdo y las aves (Ver Fig. 1.19).

La estimulación eléctrica es practicada con éxito en el ganado ovino, bovino y los cerdos, el método fue descrito por Gunn (1940) y por Lambert y Mackenzie (1940); utilizando esta técnica, el operador, deberá tener cuidado de no permitir la contaminación de la muestra empleando sólo material estéril⁵⁸ (Ver Fig. 1.20).

El semen normalmente es estéril, sin embargo es susceptible a contaminarse a su paso por la uretra; los frascos y tubos utilizados para su recolección deben presentar condiciones estériles y no contener ningún preservativo, las muestras deberán ser enviadas en refrigeración, o bien procesadas inmediatamente, de ser posible⁴⁹.

I. MUESTRAS DE FETO Y PLACENTA

1. Muestras de placenta

El procedimiento a seguir en el caso de placentas, es similar al utilizado en la recolección de órganos y tejidos, se pueden remitir porciones de placenta fresca

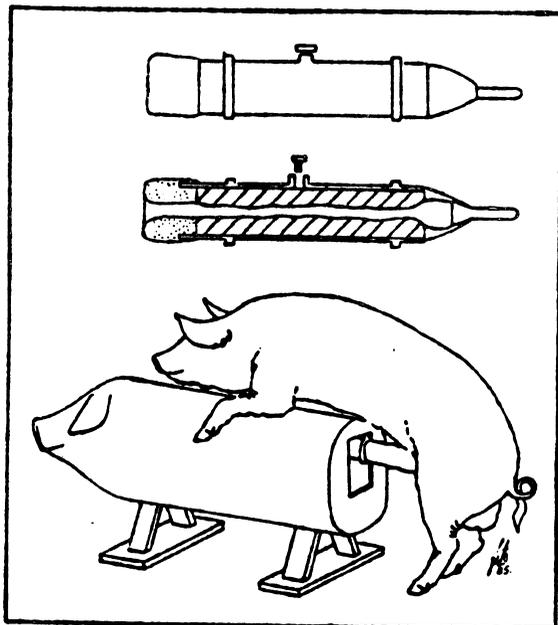
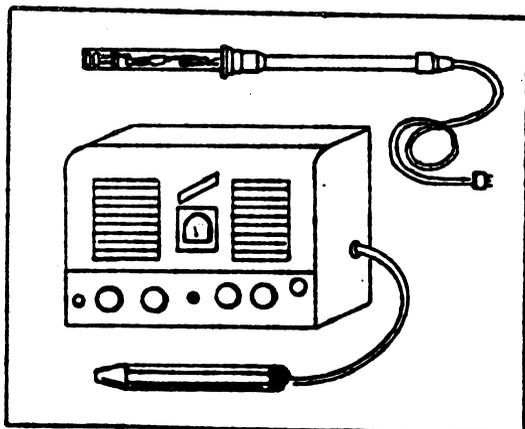


Fig. 1.18 Vagina artificial y su uso en el verraco.



Fig. 1.19 Obtención de semen en aves.

Fig. 1.20 Algunos ejemplos de electro-yaculadores.



que se encuentre dentro de la vagina (en todo caso, la placenta que cuelga por fuera de la vulva no es útil para el examen bacteriológico por presentar un alto grado de contaminación en bacterias fecaloideas).

Para aquellos casos en los cuales no pueda obtenerse la muestra de placenta, es recomendable obtener muestras de los líquidos fetales (líquido intestinal, líquido abomasal u obtener porciones de órganos afectados), puede además, obtenerse una muestra de sangre completa de la madre, sistema bastante aceptable, sobre todo, si se sospecha de Brucelosis (Ver cuadro 1.7 y Fig. 1.21).

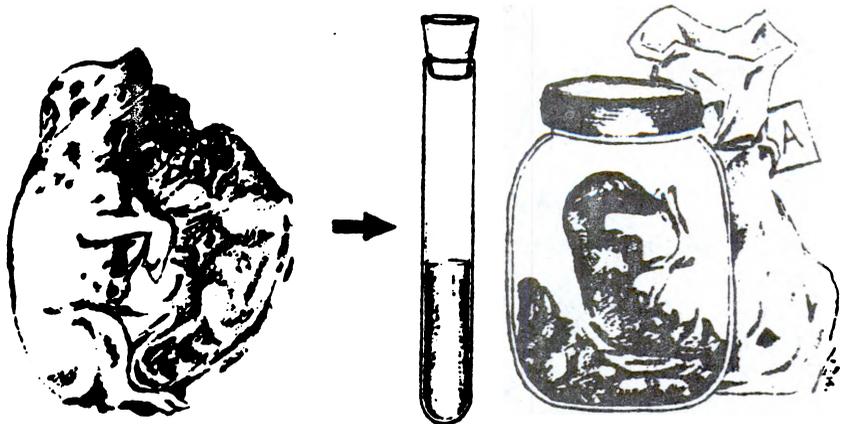


Fig. 1.21 Muestras recomendadas, en los casos de aborto

2. Remisión del feto completo

Si se desea un examen del feto, límpiense de suciedad, estiércol y paja, y envíese al laboratorio preservado en hielo seco o hielo natural¹⁷.

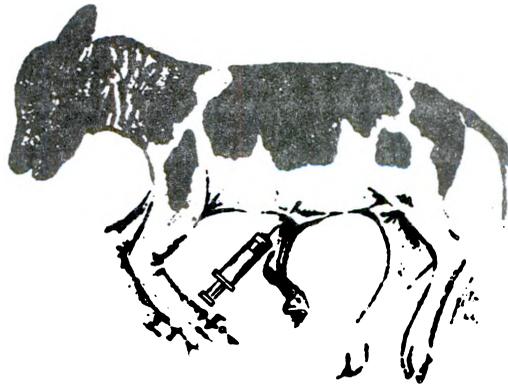
Cuando las lesiones en el feto denotan una infección de origen micótico, la muestra se debe obtener mediante un raspado cutáneo y, además incluir una muestra de líquido abomasal y remitirlas al laboratorio sin utilizar ningún preservativo⁴⁰ (Ver Fig. 1.22).

CUADRO 1.7

ALGUNAS ENFERMEDADES QUE PROVOCAN ABORTO

ENFERMEDAD	MUESTRA
Aspergilosis	Feto y placenta
Brucelosis	Feto y placenta
Candidosis	Feto y placenta
Leptospirosis	Feto y placenta
Listeriosis	Feto y placenta
Vibriosis	Feto y placenta

Fig. 1.22 Obtención de líquido abomasal en un aborto bovino, es recomendable realizar una incisión que permita exponer el abomaso, para la obtención de una muestra más pura



J. RECOLECCION DE EXUDADOS PREPUCCIAL Y VAGINAL

El examen de la secreción prepucial y vaginal por medio del microscopio o a través de un cultivo, tiene gran importancia para el diagnóstico de aquellas enfermedades infecciosas que afectan inicialmente el tracto reproductor (Ver cuadro 1.8).

Antes de recolectar la muestra, se debe tratar que el animal esté libre de orina (en ambos casos), se depila, se lava con agua y jabón toda el área externa y en el caso de los machos, debe verificarse que el orificio externo del prepucio se mantenga seco⁴⁹.

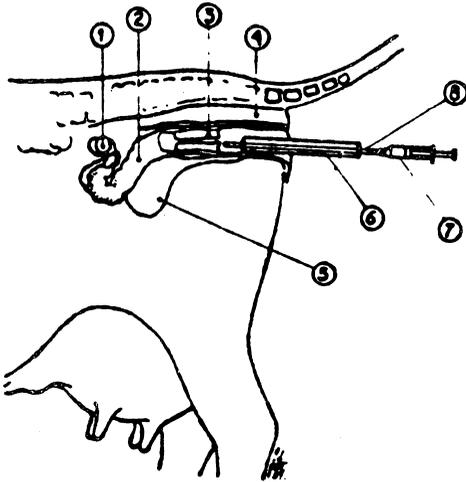
1. Obtención de exudado prepucial

La secreción prepucial se puede obtener introduciendo una pipeta de plástico adaptada a un bulbo de goma especial o conectada a una jeringa en la parte más profunda de la cavidad, (Ver fig. 1.24), el orificio externo del prepucio se ata con una banda de caucho con la ayuda de una pinza, y el exudado se puede aspirar al interior de la pipeta o de la jeringa mediante la succión de la misma³⁸.

Se recomienda realizar un lavado de la cavidad prepucial introduciendo aproximadamente 30 ml de solución salina estéril o un medio de cultivo (caldo nutritivo o caldo tioglicolato), con el líquido dentro de la cavidad se efectúan masajes de abajo hacia arriba por espacio de 15 a 20 minutos, la muestra se recoge en la misma jeringa o en un frasco previamente esterilizado.

La muestra es remitida al laboratorio plenamente identificada y lo más rápido posible, debe incluirse una historia clínica completa haciendo énfasis en los pro-

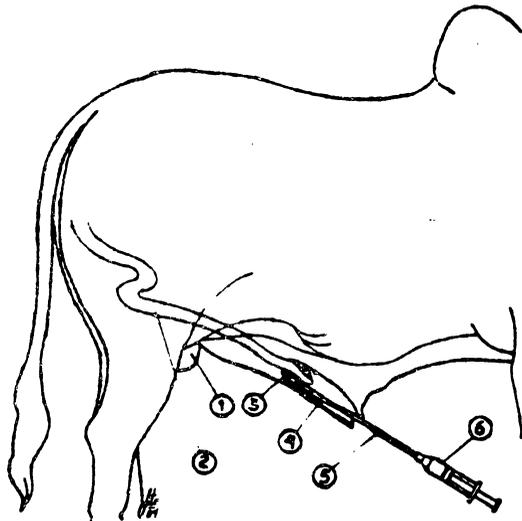
Fig. 1.23 Obtención de exudado uterino



1. Ovario
2. Utero
3. Cérvix
4. Recto
5. Vejiga
6. Espéculo de vidrio
7. Jeringa
8. Pipeta de plástico

Fig. 1.24 Recolección de secreción prepucial

1. Testículo
2. Pene
3. Smegma
4. Prepucio
5. Pipeta
6. Jeringa



blemas reproductivos presentes en la explotación.

2. Obtención de exudado vaginal

Para obtener la muestra del tracto reproductor femenino se requiere, además del material mencionado anteriormente, un espéculo el cual, se encarga de proteger el paso de la pipeta evitando la contaminación con la flora bacteriana normal de la vagina.

La secreción vaginal, es por lo general, una manifestación de infección uterina (piometra) o bien de una infección localizada, los agentes etiológicos involucrados son muy variados, por lo que se recomienda obtener estas muestras utilizando medios de cultivo de transporte (principalmente medios reducidos como el caldo tioglicolato o el medio de Stuart).

La muestra obtenida (utilizando el lavado uterino o vaginal), deberá ser remitida al laboratorio inmediatamente o bien mandarla debidamente refrigerada (Ver Fig. 1.23).

K. RASPADO CUTANEO

Con el objeto de descubrir la existencia de bacterias y hongos presentes en infecciones de la piel, siempre es conveniente efectuar un examen de las raspaduras y del material obtenido con hisopos, es también importante recurrir a la biopsia de la piel para poder examinar las estructuras más profundas.

Si se sospecha de infección por hongos, la muestra se obtiene lavando la zona con agua y jabón, desinfectándola posteriormente con alcohol al 70%. El raspado cutáneo se puede realizar con una hoja de bisturí o con un portaobjetos tratando

de incluir las escamas de las lesiones que tengan aspecto de actividad, si hay pelos afectados, estos se arrancan con la ayuda de pinzas desde su raíz (Ver Fig. 1.25). La muestra se envía sin refrigerar incluida en una caja de petri, en sobres de papel o entre dos portaobjetos^{37,40}.

En el caso de dermatitis de origen bacteriana, la muestra se obtiene utilizando hisopos estériles, los cuales son remitidos al laboratorio en tubos de ensayo conteniendo algún medio de transporte como el tioglicolato³⁸.

L. RECOLECCION DE AGUA Y ALIMENTO

Algunas enfermedades como Botulismo y Leptospirosis, pueden tener su origen en la contaminación del agua y alimento, por lo que se hace necesario su análisis en el laboratorio.

1. Obtención de muestras de agua

Las muestras de agua se pueden obtener de diferentes lugares: agua de acueducto o de yacimiento, pozos, ríos o tinacos (Ver Fig. 1.26).

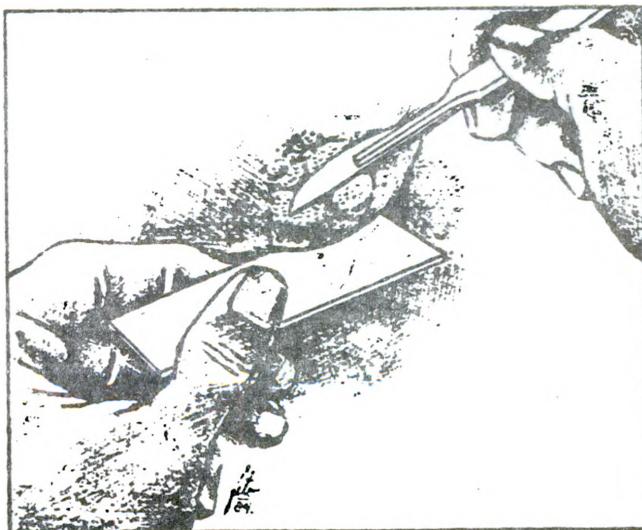


Fig. 1.25 Raspado cutáneo

En el caso de aguas de acueducto, las llaves se desinfectan cuidadosamente o

bien se flamean utilizando un mechero de alcohol, se deja correr el agua durante 1 minuto antes de tomar la muestra, la cual se recoge en frascos de boca ancha estériles cuidando que al taparlos herméticamente quede poca cantidad de aire entre el nivel del líquido y la tapa.

En casos de muestras tomadas de pozos, ríos, yacimientos o tinacos, se utiliza el mismo tipo de recipiente, se acostumbra anudarles un cordón o un alambre alrededor del cuello, dejarlos caer en el centro del pozo, estanque o río hasta que se llenen y taparlos⁴⁹.

En caso de aguas quietas, se hace necesario tomar varias muestras de diferentes sitios, previa agitación del área a muestrear. Se recomienda que al quitar la tapa del frasco, se humedezca con alcohol la superficie externa del mismo así como la porción de alambre que vaya a penetrar en el agua, prendiéndoles fuego para esterilizarlos⁴⁰.

Las muestras se deben enviar refrigeradas antes de las 12 horas de su toma, solicitando el análisis cualitativo y cuantitativo correspondiente.



Fig. 1.26

2. Obtención de muestras de alimento

La técnica de recolección, establece una serie de precauciones, ello implica, en primer lugar, precisar el objetivo de estudio, puede tratarse de un alimento sospechoso de haber causado una infección o intoxicación, puede ser el caso de un alimento con un grado de frescura incierto, o bien un problema de investigación sobre la causa de su contaminación.

El tamaño de la muestra (peso o volumen si es un sólo producto aparentemente homogéneo; o el número de unidades si se trata de un lote) está determinado por ese objetivo, y por supuesto, en la práctica, por la cantidad de alimento disponible²².

Las recomendaciones generales, son las siguientes:

- Utilizar recipientes, bolsas y material, estériles
- Al coleccionar la muestra evitar contaminaciones del ambiente tales como polvo, tierra, líquidos o de cualquier otra naturaleza. El recipiente se abrirá justamente lo necesario para introducir la muestra.
- Si se trata de alimentos a granel, pacas de heno o silos habrá que retirar una porción, obtenerla de diferentes lugares evitando mezclarlas entre sí (Ver Fig. 1.27).
- Si se trata de alimentos envasados, se deben coleccionar las unidades necesarias de acuerdo con el propósito del análisis; si es el caso de un producto de fabricación, se obtienen muestras sucesivas distribuidas a lo largo del período en el que se realice la inspección (Ver Fig. 1.28).
- En la hoja anexa que acompañe a las muestras, se consignará toda la información pertinente que pueda ayudar en la dirección de su diagnóstico.

Una vez identificadas las muestras se envían al laboratorio en refrigeración (2 a 8°C), utilizando para su envío hielo natural o hielo seco, en este caso es recomendable el uso de hielo contenido en bolsas de plástico para evitar el deshielo

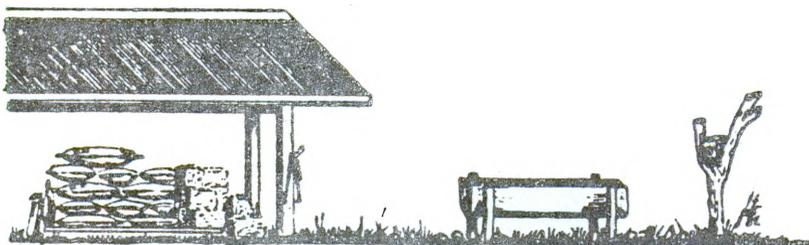


Fig. 1.27

y la posible contaminación de la muestra.

M. MUESTRAS DE BIOLÓGICOS Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS

La eficiencia de los productos biológicos y farmacéuticos como vacunas, bacterinas, hormonas, vitaminas, etc., se basa en el control de calidad del producto, así como en el método de conservación utilizado para su mantenimiento, ya que pueden ocurrir alteraciones durante su elaboración, conservación, transporte y uso, que repercuten en forma directa en una disminución del efecto deseado.

Es frecuente encontrar contaminaciones de viales y del producto mismo, por lo que es necesario realizar un análisis cuando se sospecha de estos productos (Ver Fig. 1.29).



Fig. 1.28 Alimento procesado que puede ser remitido para su examen en el laboratorio

En el caso de vacunas y bacterinas, se debe enviar el vial y el diluyente sin reconstituir por duplicado, o bien, remitir el frasco completo sin abrir y del mismo lote. La hoja clínica debe especificar detalles como: casa comercial, N.º. de lote, distribuidora comercial. Las muestras se envían en refrigeración³⁷.

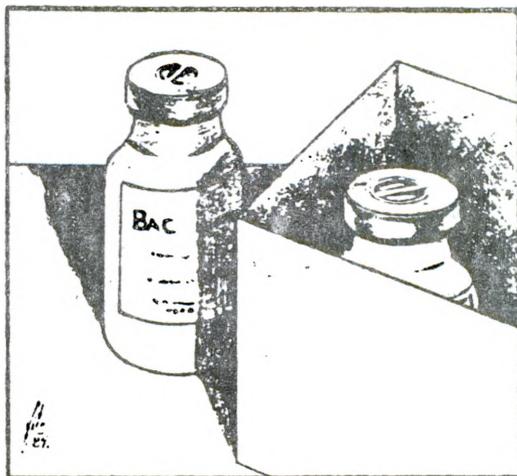


Fig. 1.29 Muestras de biológicos; debe utilizarse hielo natural como conservador para su envío al laboratorio.

Una vez presentada la manera idónea de recolectar y enviar una muestra se está en condiciones de poder tomar decisiones de qué pedir al laboratorio para poder confirmar un diagnóstico en el caso de enfermedades causadas por bacterias y -- hongos, o bien, a falta de un laboratorio, el Médico clínico de campo pueda trabajar las muestras según las técnicas que se describen en los siguientes capítulos y poder establecer la causa de la enfermedad.

CUADRO 1.8

CUADRO RESUMEN DE RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Abomasitis por clostridium	Animal entero Sangre Abomaso Abomaso	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Formal	Necropsia Hemocultivo Bacteriología Histopatología
Aborto	Feto y placenta Suero de la madre	Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatológico Aislamiento bacteriológico y micótico Aislamiento de un virus y serología
Absceso	Exudado	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
Actinobacilo- y actinomicosis	Biopsia	Refrigeración Formal	Aislamiento bacteriológico Histopatológico
Antrax	Porción de oreja Frotis sanguíneo Sangre Líquido de edema	Refrigeración en recipiente sellado y rotulado OH metílico Anticoagulante Refrigeración	Aislamiento bacteriológico Microscopía Inoculación en c. savos Microscopía
Artritis	Animal entero y vivo, líquido articular y toncillas	Refrigeración o congelación	Necropsia, histopatológico Aislamiento bacteriológico
Aspergilosis	Animal entero Organo afectado Pulmones Feto y placenta	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatológico Cultivo y aislamiento micótico Histopatología Aislamiento micótico
Blastomicosis	Tejido afectado	Formal	Histopatología
Botulismo	Contenido intestinal y estomacal Sangre	Refrigeración Anticoagulante Refrigeración	Aislamiento bacteriológico Inoculación a ratón

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Brucelosis	Sémen, exudado vaginal	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico y microscopía directa
	Abomaso, pulmón	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
	Suero	Refrigeración	Serología
	Feto y placenta	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
Candidosis	Raspado cutáneo	Refrigeración	Cultivo
	Orina	Refrigeración	Aislamiento
	Sangre	Refrigeración	Microscopía directa
	Feto y placenta	Formol	Histopatológico
Carbunco	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Músculo	Formol	Histopatología
Cólera aviar	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Hígado, pulmón	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
	bazo e intestino	Formal	Histopatología
Colibacilosis	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Intestino delgado (duodeno) bazo, ganglios linfáticos	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
	Sangre	Formol EDTA y refrigeración	Histopatología Cultivo bacteriológico
	Heces	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
Coriza	Organos afectados y exudado	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico Inoculación en animales
Criptococosis	L. C. R.	Refrigeración	Aislamiento micótico, microscopía directa
	Sangre	Refrigeración y anticoagulante	Frotis con tinta china
	Pulmón, hígado	Formol	Histopatología
	Riñón Orina	Refrigeración	Aislamiento micótico
Dermatitis micótica	Biopsia, raspado cutáneo, pelo	Formol	Microscopia directa Cultivo
	Disenteria	Animal entero y vivo	Necropsia, aislamiento bacteriológico, microscopia directa
	Heces	Refrigeración	
Edema intestinal del cerdo	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Encéfalo, intestino	Refrigeración	Bacteriología
	Ganglios linfáticos	Formol	Histopatología
	Heces		

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Edema maligno y pierna negra	Animal entero y líquido de edema	Refrigeración	Necropsia, Bacteriología, Microscopía
Enfermedad de Glasser	Animal entero Suero	Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatología Bacteriología Serología
Enfermedad crónica respiratoria	Organos afectados	Refrigeración	Bacteriología
	Animal entero Suero	Refrigeración Refrigeración	Necropsia Serología
Enterotoxemia	Asa intestinal y tejidos afectados	Refrigeración	Bacteriología y Microscopía directa
Erisipela	Animal entero Bazo, hígado, riñón, tonsilas, ganglios linfáticos, exudado articular	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Frotis sanguíneo Suero Sangre	Refrigeración OH metílico Refrigeración EDTA	Bacteriología Microscopía directa Serología Hemocultivo
Espiroquetosis aviar	Frotis sanguíneo	OH metílico	Campo obscuro
	Animal entero Bazo, hígado	Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatología Bacteriología
Epidermitis exudativa	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Piel y riñón	Refrigeración Formol	Bacteriología Histopatología
Gurma	Secreción nasal ganglios linfáticos	Refrigeración	Bacteriología
Hemoglobinuria Bacilar	Hígado y orina	Refrigeración	Bacteriología Microscopía directa
	Sangre	EDTA	Hemocultivo
Leptospirosis	Feto	Refrigeración	Bacteriología
	Suero (madre)	Refrigeración	Serología
	Orina	Refrigeración	Campo obscuro
	Agua de bebida		
Linfadenitis caseosa	Exudado	Refrigeración	Bacteriología

MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Heces, orina	Refrigeración	Bacteriología
Leche		
Suero		Serología
Feto, placenta		
Encéfalo		Histopatología
Médula	Formol	

Leche	Refrigeración	Bacteriología

Ulceras	Refrigeración	Bacteriología
Suero	Refrigeración	Serología
Secreciones	Refrigeración	Inoculación a animales

Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
Biopsia rectal	Formol	Histopatología
Heces	Refrigeración	Bacteriología
Suero	Refrigeración	Serología
Recto	Refrigeración	Microscopía directa
Ganglios linfáticos mesentéricos, cólicos y rectales	Formol	Histopatología

Orina	Refrigeración	Bacteriología Microscopía directa

Exudado conjuntival	Refrigeración	Bacteriología
Zona afectada	Formol	Histopatología

Cerdo entero vivo		Necropsia, histopatología
trompa, exudado nasal		Bacteriología

Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
Intestino, hígado	Formol	Bacteriología
riñón, bazo y pulmón		Histopatología
Heces		

Moco cervical	Refrigeración	Cultivo Bacteriológico
Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
Intestino, bazo, Hígado, riñón y pulmón	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico
	Formol	Histopatología
Heces	Refrigeración	Cultivo Bacteriológico

Suero	Refrigeración	Inoculación a animales
Heridas	Refrigeración	Bacteriología

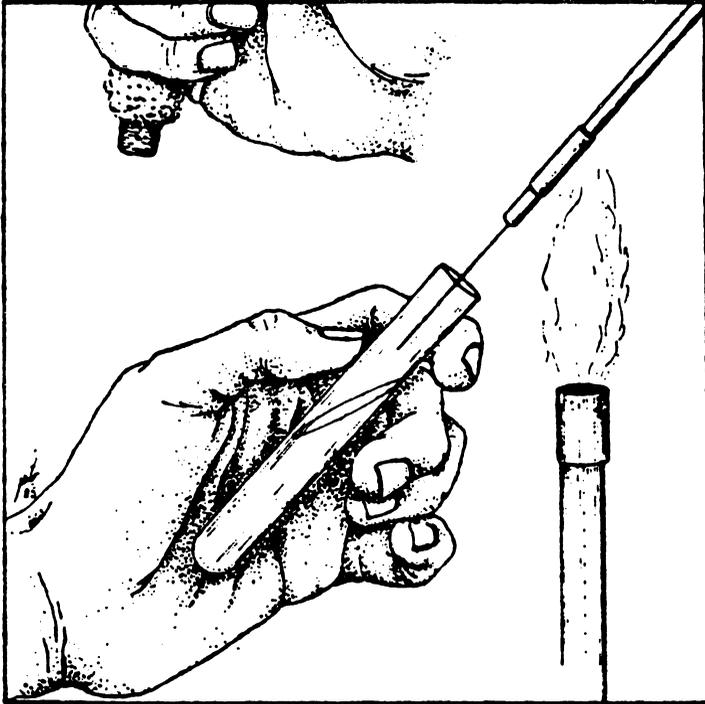
ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIOS
Tuberculosis	Tejidos afectados	Refrigeración	Microscopía directa Bacteriología Histopatología
	Secreciones, es- puto Suero	Formol Refrigeración Refrigeración	Inoculación a cobayo Serología
Tularemia	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología
	Hígado y otros Órganos afectados Suero	Refrigeración Refrigeración	Aislamiento bacteriológico Serología
Vibriosis	Suero	Refrigeración	Serología
	Sémen, moco vagi- nal Feto y placenta		Bacteriología Necropsia, histopatología Bacteriología

FUENTE: Flores Caballero, E.

Manual de Necropsias. F.E.S. C.-UNAM. 1979.
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

CAPITULO II

BACTERIOLOGIA



CAPITULO II

BACTERIOLOGIA

Durante los últimos años, el área de la bacteriología diagnóstica, ha demostrado avances considerables en la rama de la Medicina Veterinaria, esto ha permitido que el diagnóstico de las enfermedades infecciosas que afectan a los animales, se realice de una forma rápida y precisa.

Por mucho tiempo el área de diagnóstico se mantuvo distanciada de las prácticas de bacteriología. Actualmente, debido a las necesidades de incrementar la producción animal en México, se hace indispensable que el Médico Veterinario posea un conocimiento básico de los principios y técnicas utilizadas en el laboratorio de Microbiología⁴⁰.

Para poder actuar ante un caso de enfermedad infecciosa, el Médico debe saber que organismo específico es el agente causal (agente etiológico), por tanto, para diagnosticar estas enfermedades es necesario aislar e identificar el microorganismo responsable de la infección¹⁰.

Continuamente se desarrollan métodos y técnicas mejoradas para el aislamiento y la identificación de los microorganismos; en algunos casos, es posible realizar una identificación tentativa de un organismo por demostración directa mediante un estudio microscópico, pero en la mayoría de los casos es necesario realizar un cultivo en un medio artificial bajo condiciones ambientales que sean adecuadas para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo el tipo de organismo que más se sospecha de acuerdo a la naturaleza y el origen del material que se vaya a examinar, así como de los datos aportados por el Médico clínico

Este capítulo está planteado de manera que cualquier persona, con los conocimientos básicos de laboratorio, pueda demostrar, aislar e identificar en forma rápida y sencilla la mayoría de bacterias que causan enfermedad a los animales y al hombre, para que una vez logrado lo anterior pueda llevar a cabo pruebas in vitro de sensibilidad a los antimicrobianos, y así poder establecer un posible esquema terapéutico.

El propósito de esta sección de diagnóstico es el de informar al estudiante de Medicina Veterinaria de los principios, técnicas y evaluación del diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas, basándonos en los 3 aspectos básicos en el diagnóstico microbiológico³²:

- a. Demostración
- b. Aislamiento
- c. Identificación

Se debe tener en cuenta por el estudiante que esta sección es el complemento o aplicación de sus conocimientos en el área de la bacteriología general y una base en sus próximos estudios de las enfermedades infecciosas y clínicas en las diferentes especies domésticas.

A. DEMOSTRACION

Tiene por objeto la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico remitido al laboratorio de diagnóstico, la demostración puede realizarse mediante el examen directo de una extensión sin teñir, o bien, utilizando colorantes específicos³².

Ventajas:

- Se obtienen resultados inmediatos.

- Requerimientos mínimos de equipo, tiempo, técnicas de laboratorio, espacio de trabajo, etc.
- Puede ser el único método de diagnóstico probable, como en el caso de que el microorganismo problema no pueda ser cultivado in vitro (Mycobacterium leprae) o poseer características de cultivo especiales.
- Nos puede orientar tentativamente a un diagnóstico y tratamiento rápidos.
- Nos puede dar una idea de la cantidad de gérmenes relacionados en el proceso infeccioso (forma, tamaño y disposición).
- Nos muestra sus características de tinción.

Limitaciones:

- Se requiere la presencia de grandes cantidades de microorganismos para la obtención de resultados positivos.
- Se calcula que aproximadamente por cada bacteria que se observa al microscopio con el objetivo de inmersión existen 10^6 bacterias por ml o gramo de muestra.
- En la mayoría de los casos no proporciona respuesta de la acción de toxinas, anticuerpos, etc., relacionados con el proceso in vitro. Respuesta más específica se puede obtener con el uso de anticuerpos marcados (fluoresceína, ferritina, enzimas, etc.) o utilizando microscopía de campo oscuro.

1. CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS BACTERIAS

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas, sin embargo, el desarrollo de la Microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas, desarrolladas en medios desprovistos de organismos contaminantes.

Morfológicamente, las bacterias se clasifican dentro de los siguientes grupos: cocos, los cuales, cuando están totalmente desarrollados libres, son perfectamente

te esféricos; cuando dos o más están en oposición pueden ser ligeramente aplana- dos a lo largo de la superficie de contacto, tomando aspecto oval; bacilos, son bastones rectos cuya longitud es de dos a diez veces su anchura, con los extre- mos algo redondeados, como en la Salmonella typhi, o cortados en escuadra, como el Bacillus anthracis; los Vibrios, son pequeños organismos que adoptan una for- ma de coma (con una sola curva); los espirilos, son de formas más largas y sinuo- sas, de cuatro a veinte curvas, con apariencia de un sacacorchos animado 5,52 (Ver Fig. 2.1 . y Cuadro 2.1).

COCOS	BACILOS		VIBRIOS ESPIROQUETAS
	no forman esporas	formadores de esporas	
Staphylococcus	E. coli	Clostridium	Treponema
Streptococcus	Brucella	B. anthracis	Leptospira
Gonococo	Shigella		Borrelia
Meningococo	Salmonella		Vibrio

Cuadro 2.1 Ejemplos de tipos morfológicos de algunas bacterias.

Fig. 2.1 Morfología bacteriana.

1. Cocos aislados
2. Cocos a pares (Diplococos)
3. Cocos en cadena (Streptococcus)
4. Cocos en racimo (Staphylococcus)
5. Cocos en tétrada (Sarcinas)
6. Cocobacilos
7. Bacilos en forma de clava o maza
8. Bacilos con extremos redondeados
9. Bacilos con extremos cortados en escuadra
10. Bacilos fusiformes
11. Vibriones
12. Spirilla
13. Borrelia
14. Treponema
15. Leptospira

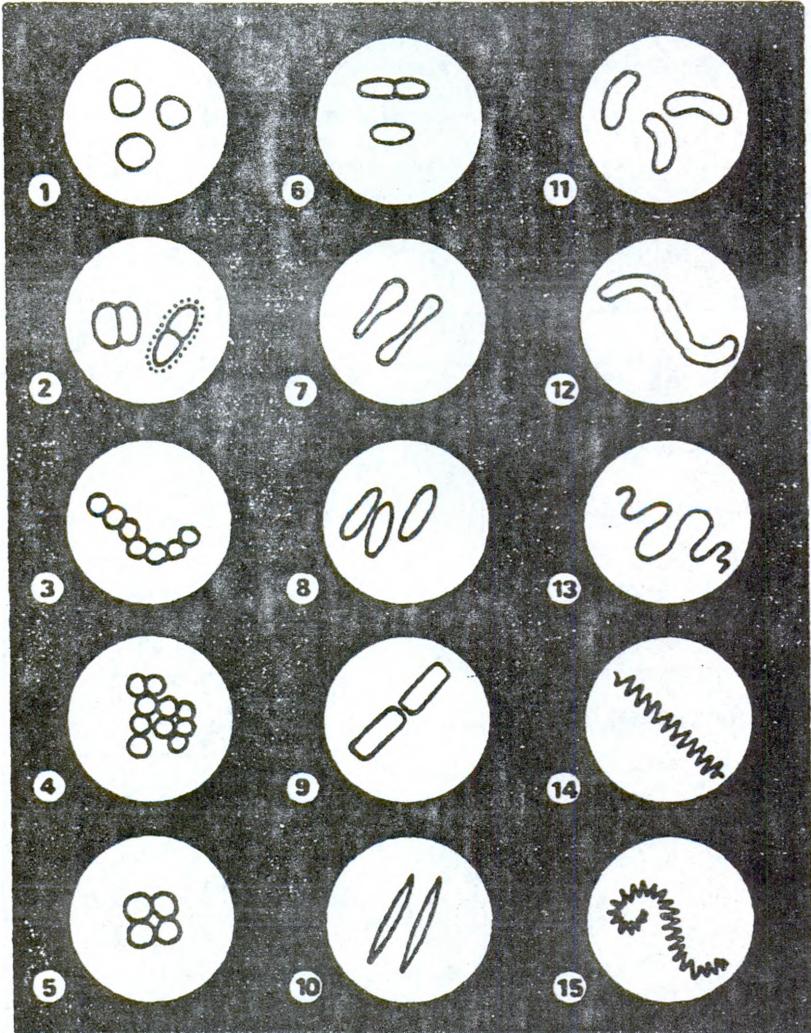


Fig. 2.1 Morfología bacteriana.

2. OBSERVACION DE MICROORGANISMOS VIVOS SIN TEÑIR

Los microorganismos se encuentran en su estado más característico y natural en los cultivos jóvenes y en preparaciones frescas no teñidas, observándose mejor por microscopía de contraste de fase y campo oscuro. Tal examen podrá demostrar no sólo la forma o formas de los microorganismos, sino que, además si tiene, o no movimientos propios¹⁸.

La mayoría de los microorganismos aparecen incoloros cuando se les observa in vivo aunque existen algunos, que presentan pigmentos como en el caso de las algas fotosintéticas que poseen clorofila. Utilizando el objetivo de inmersión del microscopio es posible descubrir detalles estructurales internos en las células más grandes, pero es prácticamente imposible en organismos tan pequeños como las bacterias, esto se debe parcialmente, a que el poder de resolución del microscopio de campo claro no alcanza a poner de manifiesto estructuras más pequeñas de 0.2 micrómetros, y también a que el citoplasma tiene un índice de refracción de la luz muy bajo, por lo que la observación de microorganismos resulta difícil cuando no se tiñen^{26, 40}.

La observación de microorganismos vivos se puede realizar satisfactoriamente, utilizando preparaciones húmedas (como la gota suspendida o utilizando portaobjetos excavados) las cuales, son fáciles de montar y requieren de un mínimo de material. La técnica puede realizarse de la siguiente manera: a) se deposita una delgada capa de vaselina alrededor del borde de la depresión en el portaobjetos excavado; b) en el centro del cubreobjetos se coloca, un asa, una gotita de la suspensión de la bacteria; c) se toma el portaobjetos cóncavo invertido y se presiona firmemente contra el cubreobjetos y d) con gran rapidez se vuelve a voltear toda la preparación y se observa^{10, 5}.

3. TECNICAS DE TINCION

Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano; si la célula no ha muerto, el proceso mismo de la tinción la mata.

Los colorantes más comunmente usados son sales. Una sal, es un compuesto formado por un ion cargado positivamente y un ion cargado negativamente, las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupo fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente, lo cual les hace ser los más utilizados en citología bacteriana; los colorantes ácidos no tiñen la célula bacteriana y, por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo un color de contraste, por ejemplo^{54, 34}:

En colorante simple Azul de metileno es la sal cloruro de Azul de metileno, que se disocia de la siguiente manera:



El color que se adquiere, reside en el ion Azul de metileno cargado positivamente.

Las células bacterianas tienen una débil carga negativa cuando el PH del medio externo está cerca de la neutralidad, que es lo que generalmente ocurre, la célula bacteriana cargada negativamente se combina con el ion Azul de metileno, cargado positivamente, con lo cual se tiñe la bacteria, las diferencias en la carga dan lugar a una afinidad entre el colorante y la célula bacteriana.

Para los estudios bacteriológicos existen varios métodos de tinción, las ventajas que ofrece el uso de las tinciones en la identificación bacteriana son: a) proporcionar contraste entre el microorganismo y el medio que le rodea, permitiendo llevar a cabo la diferenciación entre los distintos tipos morfológicos (Ver Fig. 2.1):

b) permite el estudio de estructuras internas de la célula bacteriana, tales como paredes celulares, vacuolas o cuerpos nucleares; c) permiten al bacteriólogo, emplear mayores ampliaciones.

La amplia gama de colorantes de que dispone actualmente el bacteriólogo, se emplean en métodos que son modificaciones de las técnicas de tinción básicas (Ver cuadro 2.2).

CUADRO 2.2

CLASIFICACION DE LAS TINCIONES

I. TINCION SIMPLE

- a) Colorantes básicos
- b) Colorantes ácidos
- c) Colorantes indiferentes

2. TINCIONES DIFERENCIALES

- a) Tinción de Gram
- b) Tinción de ácido-resistentes

3. TINCIONES ESTRUCTURALES

- a) Tinción de Fielgen
- b) Tinción de endosporas
- c) Tinción de pared celular
- d) Tinción de flagelos
- e) Tinción de cápsulas

Fuente: Van Demark y Seeley, 1973.

3.1 PREPARACION DE UN FROTIS FIJO PARA TINCION

Antes de teñir, se debe "fijar" el material que se va a observar. Los portaobjetos que se empleen para realizar las extensiones deben estar limpios y bien marcados para su identificación y para la delimitación del área en que hay que colocar la muestra, el portaobjetos puede dividirse en varias secciones con un lápiz marcador y colocarse varias extensiones en una misma placa, a condición de que todas se vayan a teñir de la misma manera¹⁹.

PROCEDIMIENTO:

- La técnica para realizar el frotis bacteriano es variable si el cultivo se encuentra en medio sólido o en líquido. Con un asa de inoculación se coloca una gota pequeña del cultivo que se va a teñir si esta, proviene de un medio líquido; cuando se toma a partir de un cultivo sólido, se coloca una gota de agua destilada en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco del crecimiento del cultivo⁵⁴.
- Extender la gota sobre el portaobjetos formando una capa fina, debe evitar se preparar un frotis demasiado grueso.
- Seque los portaobjetos al aire o manteniéndolos sobre la llama del Bunsen.
- Cuando se haya secado el frotis, pase el portaobjetos tres veces por la llama del mechero con la capa hacia arriba, teniendo cuidado de no aplicar el calor en forma excesiva ya que estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir⁴⁶ (Ver Fig. 2.2).

Aunque la fijación hecha de esta manera es buena para el trabajo corriente, no es la mejor, ya que la aplicación del calor no se puede precisar con exactitud. Se pueden emplear otros métodos, como la inmersión de las laminillas en alcohol etílico, formol, solución acuosa saturada de bicloruro de mercurio, líquido de Zenker

MEDIO SOLIDO

MEDIO LIQUIDO

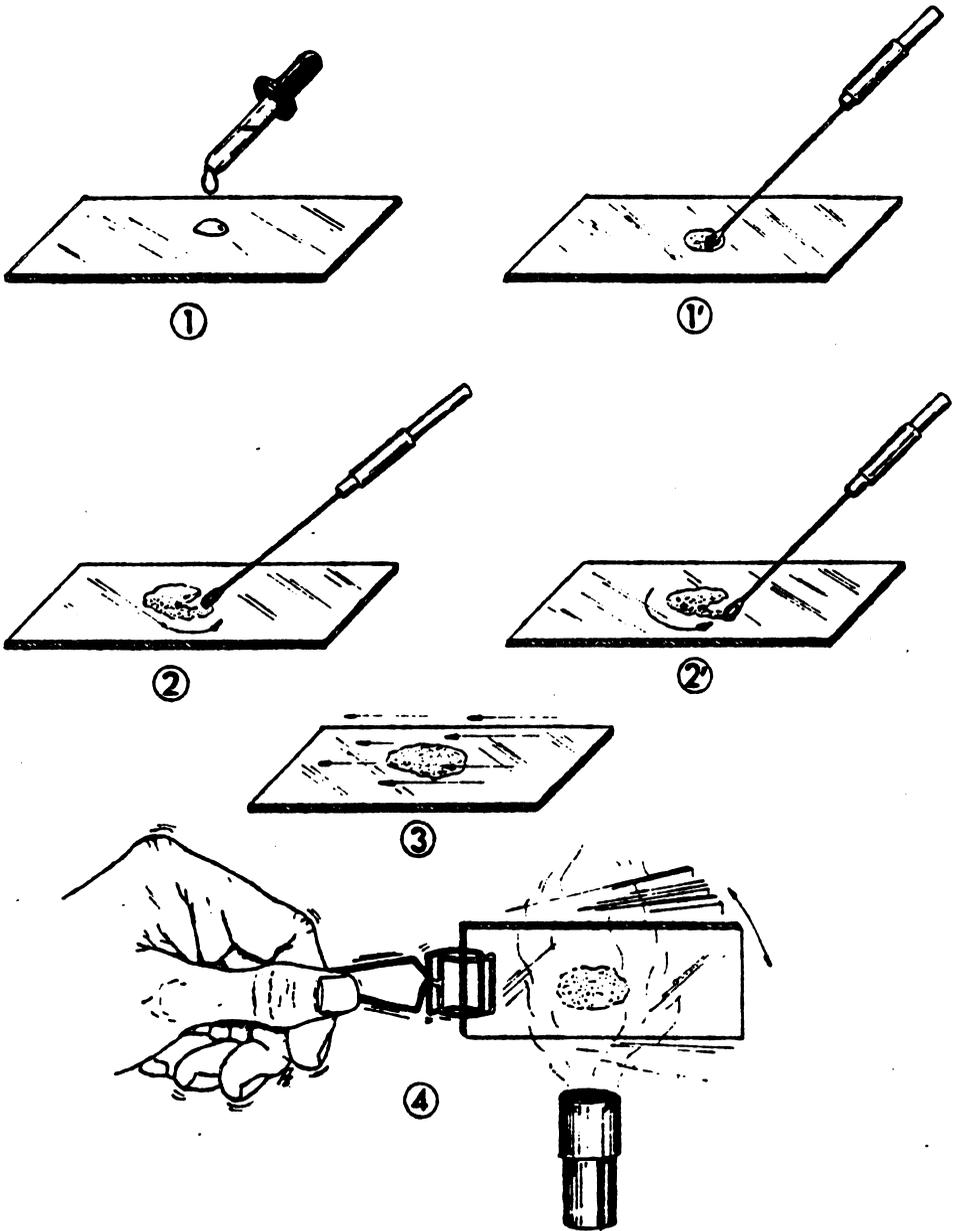


Fig. 2.2 Preparación de un frotis fijo para tinción

y ácido acético, si se utilizan fijadores químicos deben eliminarse con agua antes de teñir⁵².

NOTA: Es importante recordar que la fijación por calor puede no matar las bacterias, por lo que todas las laminillas deben de ser tratadas con el respeto y precaución inherentes a todo objeto presuntamente patógeno³³.

3.2 TINCIONES SIMPLES

Los colorantes utilizados para tinción de las bacterias son en su mayoría colorantes básicos de anilina, tales como Azul de metileno, Violeta de genciana y Fucsina, para tinción simple suelen emplearse en solución acuosa al 5%, preparada generalmente a partir de soluciones alcohólicas saturadas filtradas; la tinción se logra cubriendo la película bacteriana fijada con solución colorante y dejándola actuar de 1/2 a 1 1/2 minutos, según la fuerza del colorante empleado, el Azul de metileno es el más débil de los tres colorantes mencionados; el Violeta de genciana, el más fuerte^{33, 51, 15}.

El exceso de colorante se quita lavando con agua, dejando secar a medio ambiente.

Las preparaciones teñidas se examinan directamente; no es necesario el uso de cubreobjetos.

3.3 TINCIONES DIFERENCIALES

a. TINCION DE GRAM

En 1884 un médico danés, Christian Gram, desarrolló un método de tinción que lle-

va su nombre y que es de enorme utilidad en cualquier laboratorio de Bacteriología.

La tinción por el método de Gram es la más apropiada para conseguir información de valor y debe hacerse en todos los casos en que esté indicada la tinción, se emplea también como método habitual para el examen de cultivos, a fin de determinar su pureza y con fines de identificación. Esta técnica, proporciona información sobre propiedades estructurales de las bacterias que permiten separarlas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas^{19, 40, 56}.

Los cultivos utilizados para ser teñidos por el método de Gram deben de ser jóvenes, es decir, deben haber sido incubados por un corto tiempo (máximo 24 horas), ya que en los cultivos viejos hay liberación de enzimas por autólisis, las enzimas atacan la pared celular y modifican sus propiedades estructurales convirtiendo así gérmenes Gram positivos en Gram negativos⁵¹.

Se han ideado muchas fórmulas y procedimientos para la tinción de Gram, las bases químicas de la coloración de Gram han sido revisadas recientemente por Dubos, Bartholomew y Mittler, Preston y Morrel (1962).

a.1 MODIFICACION DE HUCKER

En los Estados Unidos el método aplicado es, en ocasiones, referido como la modificación de Hucker (Hucker y Conn, 1923) y en Inglaterra como la modificación de Lillie (1928)^{7, 11, 13, 18, 19}.

1. SOLUCIONES

- Cristal violeta con oxalato amónico

Solución A:

Cristal violeta (garantizado)	2 g.
Alcohol etílico (al 95%)	20 ml.

Solución B:

Oxalato amónico	0.8 g.
Agua destilada	80 ml.

Mezclar las soluciones A y B, almacenar durante 24 horas y filtrar a través de papel.

- Solución de yodo (Mordiente)

Yodo	1 g.
Yoduro potásico	2 g.
Agua destilada	300 ml.

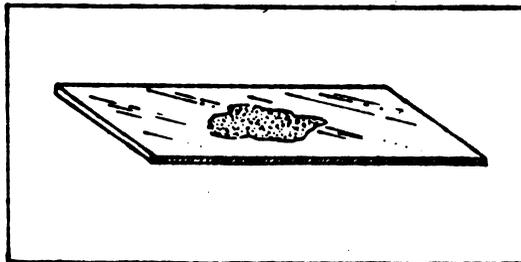
Triturar en un mortero el yodo y el yoduro potásico y añadir algunos mililitros de agua poco a poco hasta conseguir su disolución. Almacenar en un recipiente opaco.

- Coloración de contraste

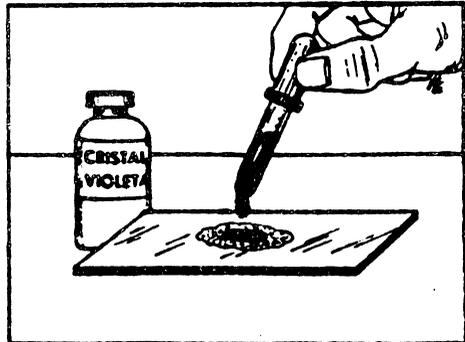
Safranina O (solución al 2.5% en alcohol etílico al 95%)	10 ml.
Agua destilada	100 ml.

2. PROCEDIMIENTO

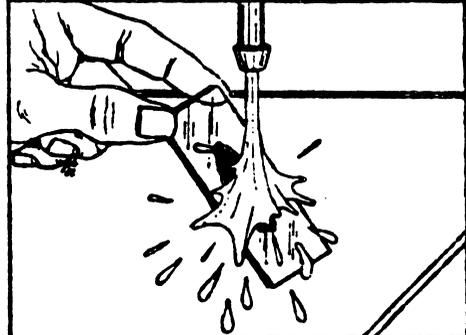
- Preparar un frotis fijo para tinción de un cultivo de 18 a 24 horas.



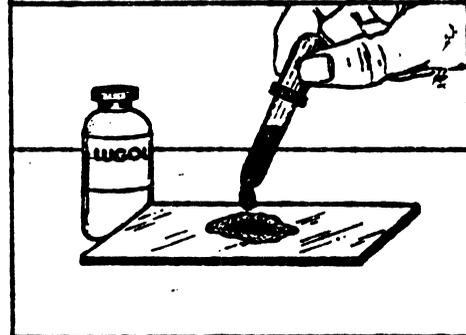
- Aplicar la solución de oxalato de amonio - cristal violeta durante 30 segundos.



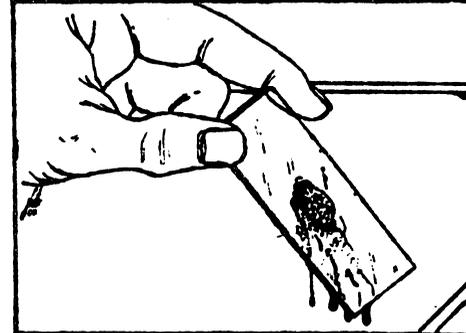
- Lavar perfectamente con agua de la llave.



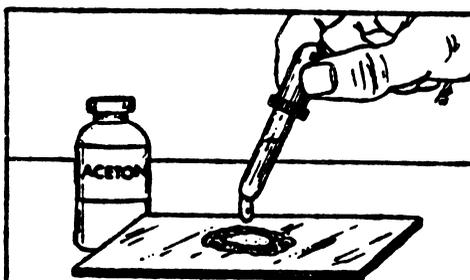
- Aplicar la solución de lugol durante 30 segundos.



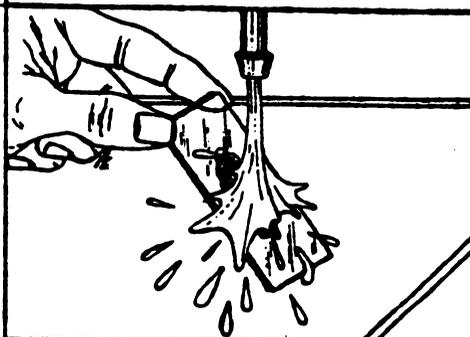
- Escurrir la solución de lugol, pero no lavar.



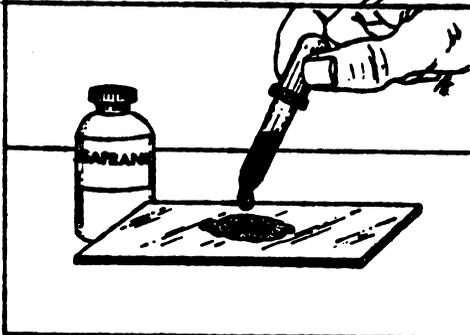
- Decolorar con algunas gotas de acetona.
(La acetona no deberá permanecer en el frotis por más de 2 a 4 seg.).



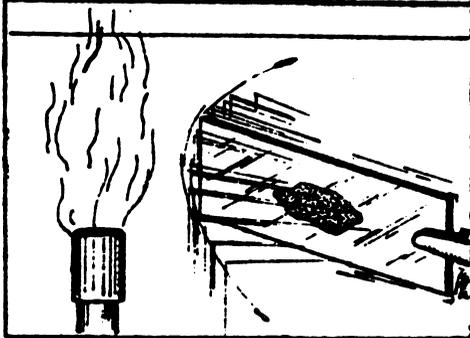
- Lavar rápidamente con agua.



- Contrastar con safranina al 0.5% durante 30 seg.



- Lavar y mantener por un extremo para escurrir, o secar cerca del mechero.



Cuadro 2.3 Etapas en la tinción de Gram

PASO	METODOS	R E S U L T A D O S	
		GRAM (+)	GRAM (-)
Tinción inicial	Cristal violeta durante 30 segundos	Violeta	Violeta
Mordiente	Aplicar lugol durante 30 segundos	Violeta	Violeta
Decoloración	Solución de alcohol y acetona (gotas), 3 a 5 segundos	Violeta	Se decolora
Contraste	Safranina durante 30 segundos	Violeta	Se tiñen de rojo

FUENTE: Van Demark y Seeley, 1973.

Escasos microorganismos Gram negativos no se tiñen bien con la safranina, ejemplos son: Haemophilus influenzae y Yersinia pestis. Los frotis de estos microorganismos deberán ser contrastados utilizando Fucsina fenicada débil durante 30 segundos.

Toda la laminilla deberá estar cubierta con cada reactivo y el reactivo anterior deberá ser completamente eliminado en cada etapa, cantidad insuficiente del reactivo resultará en una tinción o decoloración deficiente.

3. RESULTADO

Los microorganismos Gram positivos se tiñen en azul o púrpura, y los organismos Gram negativos, en rojo.

a.2 MODIFICACION DE REED^{2, 3, 4, 25, 48}

Los objetivos principales de esta modificación son: 1) obtener un colorante primario más estable que el original, ya que éste se deteriora rápidamente, 2) redu-

cir el tiempo requerido para completar la técnica^{40, 46}.

1. SOLUCIONES

- Solución primaria:

Cristal violeta	2.5 g.
Agua destilada	1000 ml.

- Solución "sensibilizante":

Bicarbonato de sodio	12.5 g
Agua destilada	1000 ml.

- Mordiente:

Yodo	20 g.
Hidróxido de sodio (sol. molar)	100 ml.

Disolver el yodo en el hidróxido de sodio y agregar:

Agua destilada	100 ml.
----------------	---------

- Decolorante:

Alcohol etílico (95%)	750 ml.
acetona	250 ml.

- Solución de contraste:

Fucsina básica (sol. saturada en alcohol al 95%)	100 ml.
Agua destilada	900 ml.

2. PROCEDIMIENTO

- Cubrir el frotis fijo con la solución de cristal violeta (una o dos gotas son suficientes para cubrir el área del frotis).
- Agregar una cantidad igual de la solución de bicarbonato de sodio, dejar actuar esta mezcla por 15 segundos. Lavar con agua corriente de la llave.
- Aplicar el mordiente, y dejar actuar durante 15 segundos. Lavar con agua corriente.
- Tratar el frotis con el decolorante por espacio de 3 a 5 segundos y lavar nuevamente con agua corriente.
- Agregar el colorante de contraste y dejarlo actual por 15 segundos y lavar con agua corriente.
- Secar el frotis al aire o cerca del mechero.

3. RESULTADO:

Las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta, en el caso de ser Gram negativas de color rosa o rojo.

En este método es crítico el tiempo de cambio de color, por lo que cada laminilla debe tratarse por separado y en forma individual. Preston y Morrell (1962) han sugerido el uso de una mezcla de yodo - acetona, por lo que el cambio de color no es posible en exceso.

El empleo de Fucsina fenicada diluida como contraste, es necesario en circunstancias especiales como para la demostración de bacilos Gram negativos anaerobios que tiñen mal (Bacteroides) provenientes de material purulento ya desnaturalizado en el cual las hebras de fibrina pudieran enmascarar la reacción³³.

a.3 PRUEBA DE KOH AL 3%^{19, 69}.

Otros métodos utilizados recientemente para la identificación y diferenciación de las bacterias Gram positivas y negativas incluyen, la prueba de KOH⁴⁰.

Es una prueba muy útil para confirmar, en caso de duda, si la bacteria es Gram positiva o negativa, se ha reportado que existe una correlación de un 92% con las bacterias sometidas a la reacción de Gram¹¹.

1. SOLUCIONES

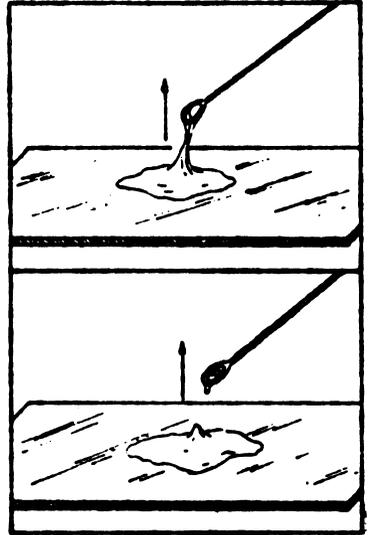
- Reactivo:
Hidróxido de potasio al 3%

2. PROCEDIMIENTO

- Colocar en un portaobjetos, una gota del reactivo
- Con el asa de inoculación, mezclar con movimientos giratorios una muestra de la colonia problema, aproximadamente por un minuto.

3. RESULTADOS:

- Gram negativas: al separar el asa de la mezcla - queda entre ellas una hebra viscosa dentro de los 5 a 60 segundos.
- Gram positivas: no existe dicha viscosidad.



b. TINCION DE ACIDO - RESISTENTES

La tinción de ácido resistentes es una técnica diferencial que demuestra la resistencia de una célula teñida a ser decolorada por los ácidos. En algunas micobacterias y actinomicetos, la propiedad de ácido resistencia está relacionada con su alto contenido en lípidos, por lo tanto, la tinción de estas bacterias se debe realizar con colorantes que presenten mucha afinidad para tales células y utilizan do una fuente de vapor⁵⁴.

Al grupo de bacterias que presentan estas características se les denomina ácido-alcohol resistentes. El grupo está compuesto por bacterias del género Mycobacterium incluyendo al bacilo tuberculoso, al de la lepra y al de la enfermedad de Johne o paratuberculosis del ganado; también por las especies saprófitas como el Mycobacterium phlei, presente en el suelo y polvo; y por algunos actinomicetos, los cuales son bacterias que guardan similitud morfológica con los hongos, el género No-cardia es un ejemplo de actinomicetos⁴⁰.

En este método se tiñe con fucsina fenicada, se decolora con una solución de ácido - alcohol y se da contraste a las células bacterianas, las bacterias ácido resistentes se decoloran más lentamente por el ácido-alcohol que otros organismos, y retienen el color de la tinción inicial después de contrastar¹⁵.

Se han definido varios métodos de tinción en frío (Aubert, 1950; Hook, 1962) pero tienen poca o ninguna ventaja sobre el método convencional de Ziehl - Neelsen cuando se aplican a cultivos puros¹⁸.

b.1 MÉTODO DE ZIEHL - NEELSEN (1883)^{11, 18, 34, 46}.

1. SOLUCIONES

- Colorante primario - Fucsina fenicada:

Fucsina básica	3 g.
Alcohol etílico al 95%	100 ml.
Fenol al 5%	900 ml.

- Decolorante - Alcohol ácido:

ácido clohídrico	3 ml.
Alcohol al 95%	97 ml.

- Colorante de contraste:

Solución A:	
Azul de metileno (90% contenido de colorante)	03 g.
Alcohol etílico al 95%	30 ml.
Solución B:	
Hidróxido de potasio	0.01 g.
Agua destilada	100 ml.

Mezclar las soluciones A y B. Algunos autores prefieren la solución acuosa de verde de malaquita al 0.5% o solución de ácido pícrico como colorante de contraste².

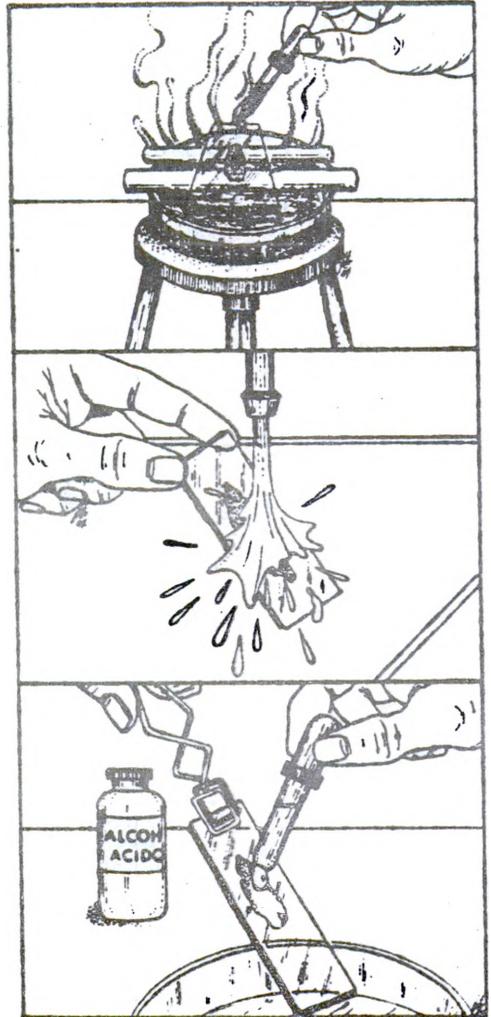
2. PROCEDIMIENTO

- Preparar un frotis fijo para tinción. Cubrir la laminilla con solución fuerte de fucsina fenicada y calentar hasta que se desprenda vapor (pero no hervir).

- Después de 3 o 4 minutos aplicar más calor; no dejar secar el colorante en la laminilla (utilizar un trozo de papel absorbente sobre el frotis).

- Aproximadamente 5 a 7 minutos después de la primera aplicación de calor, lavar perfectamente la laminilla con agua corriente.

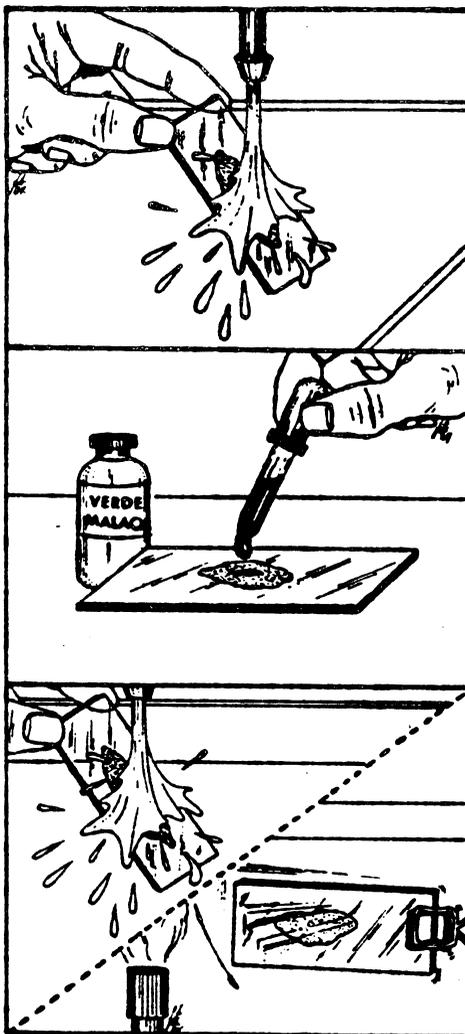
- Decolorar con alcohol ácido hasta que todas las trazas de color rojo desaparezcan del frotis. Deberán realizarse lavados intermitentes con agua y alcohol ácido.



- Lavar perfectamente con agua de la llave cuando la decoloración se haya completado.

- Contrastar con azul de metileno o verde de malaquita al 0.5% durante 1 minuto.

- Lavar y dejar escurrir sosteniendo por un extremo la laminilla; no utilizar papel secante.



3. RESULTADO:

Los microorganismos ácido resistentes se tiñen en rojo, otros microorganismos se tiñen de azul o verde según el colorante de contraste utilizado.

b.2 METODO DE KINYOUN (1915)

Es un método empleado para la identificación de micobacterias que no requiere la aplicación de calor^{11, 32}.

1. SOLUCIONES:

- Fucsina fenicada

Fucsina básica	4.0 g.
Fenol en cristales	8.0 g.
Alcohol (95%)	20.0 g.
Agua destilada	100.0 ml.

- Decolorantes

Ac. sulfúrico sol. acuosa al 1%

- Azul de metileno

Azul de metileno	0.3 g.
Agua destilada	100.0 ml.

2. PROCEDIMIENTO

- Cubrir el frotis con fucsina fenicada por 3 minutos.
- Lavar con agua corriente, y decolorar con ácido sulfúrico hasta que desaparesca el exceso de colorante.
- Lavar con agua corriente y contrastar con azul de metileno por 30 segundos.
- Lavar con agua corriente, secar y observar al microscopio.

3. RESULTADO:

Las bacterias ácido resistentes se tiñen de rojo, las demás bacterias se tiñen de azul.

3.4 TINCION DE ESTRUCTURAS

Para los estudios bacteriológicos hay varios métodos de tinción además de la tinc

nica de Gram o alguna de sus modificaciones. Para determinaciones especiales pueden ser útiles, el método para teñir esporas, cápsula y flagelos. Es importante recordar, que los organismos con características de tinción conocidas, deberán incluirse como controles de tinción en todos los casos¹⁹.

a. TINCION DE ESPORAS

La formación de esporas es un fenómeno poco común, ya que solamente dos géneros bacterianos de interés veterinario son capaces de formarlas: Clostridium y Bacillus, y de las últimas en particular, sólo B. anthracis es indudablemente patógeno; la importancia de las bacterias formadoras de esporas, por ejemplo, Cl. tetani, se deriva de su asociación en la contaminación de heridas; entre otros Clostridios patógenos se encuentran los causantes del botulismo, la "pierna negra" y de la gangrena gaseosa⁴⁰.

Las esporas se observan de la manera más simple como cuerpos refringentes intracelulares, o bien, liberadas de la sustancia vegetativa de la célula, a diferencia de la célula vegetativa que la produce, la espora es muy resistente y puede sobrevivir largos períodos de tiempo, incluso en medios desfavorables por altas temperaturas, sustancias químicas o materia orgánica en descomposición⁵⁶.

La espora se tiñe fácilmente, pero una vez teñida resiste fuertemente la decoloración y el contraste, la tinción de esporas, se realiza utilizando los siguientes métodos:

a.1 Método de Schaefer y Fulton (1953)^{19, 33, 55}.

1. SOLUCIONES

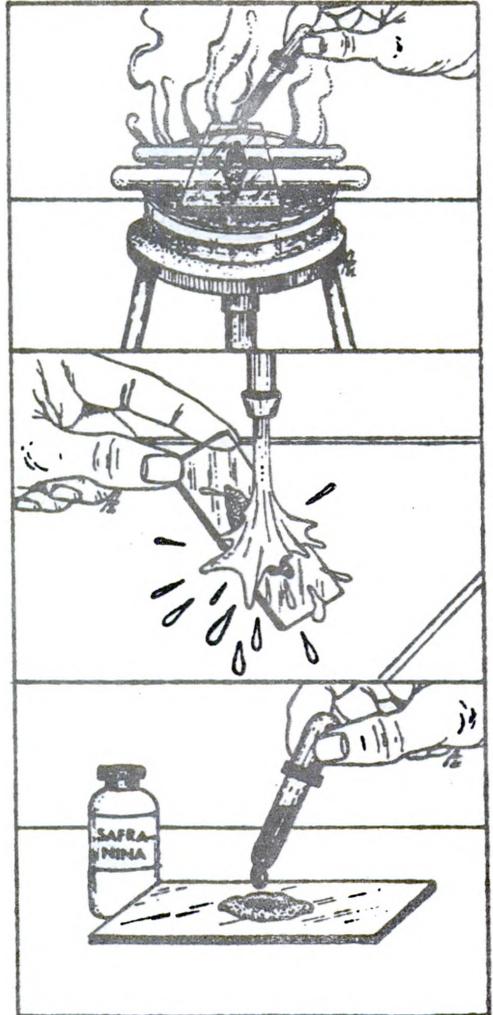
- Verde de malaquita (al 5%) en agua destilada (si se está recién preparada, dejarla reposar 30 minutos y filtrar).
- Safranina (al 0.5%) en agua destilada

2. PROCEDIMIENTO:

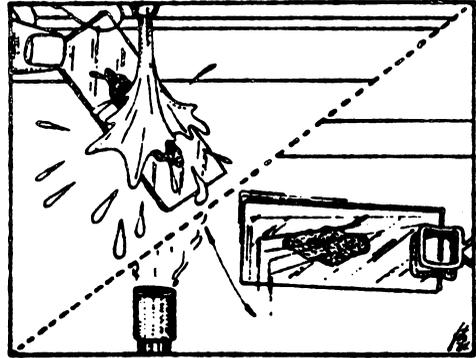
- Cubrir la extensión (fijada con calor) con verde de malaquita y calentar hasta la formación de vapor durante 1 minuto.

- Lavar perfectamente con agua corriente.

- Contrastar, aplicando safranina en solución acuosa durante 15 a 30 segundos.



- Lavar, escurrir y secar cerca del mechero.



3. RESULTADOS:

Las esporas se tiñen de verde; el cuerpo de la bacteria se tiñe de color rojo.

La espora puede estar localizada en el centro del cuerpo celular, en cuyo caso se denomina central; puede estar entre el centro y un extremo de la célula, en el caso de ser subterminal, o bien, puede ser terminal si aparece en alguno de sus extremos (Ver Fig. 2.3)³⁴.

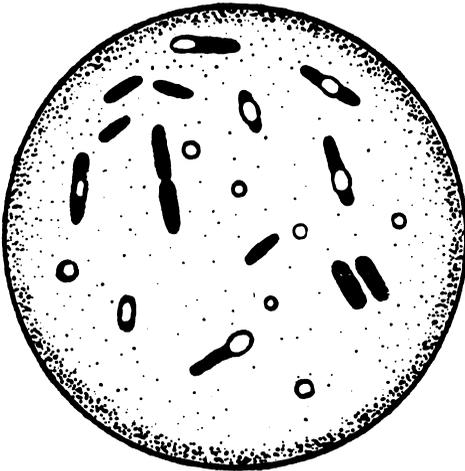


Fig. 2.3 Tipos de esporas bacterianas: terminal, subterminal, central, esférica y oval¹⁵.

El método para la demostración de esporas, puede emplearse como tinción en frío, dejando actuar al verde de malaquita durante 10 minutos.

a.2 METODO DE COLOBACION PARA ESPORAS EN FRIO¹¹, 51.
(Bartholomew y Mittwer, 1950).

1. SOLUCIONES:

- Verde de malaquita (al 7%) en agua destilada.
- Safranina en solución acuosa al 0.25%.

2. PROCEDIMIENTO:

- Preparar un frotis fijo para tinción.
- Teñir durante 10 minutos con verde de malaquita sin aplicar calor.
- Lavar durante 10 segundos utilizando agua corriente.
- Contrastar con safranina durante 15 segundos.
- Lavar y secar.

3. RESULTADO:

Las esporas se tiñen de verde; el resto de la célula de rojo.

b. TINCION DE CAPSULAS

La cápsula bacteriana consiste en limo excretado, habitualmente un polisacárido, aunque en un caso (Bacillus anthracis) consiste en un polipéptido del ácido D-glutámico, las células encapsuladas forman, en los medios de cultivo, colonias lisas y mucoides, mientras que las células no capsuladas producen colonias rugosas. La única función conocida de la cápsula es la de proteger a la bacteria de la fagocitosis y de los virus que deben fijarse a la pared celular³⁴.

El grosor de la cápsula varía de especie a especie, y aún dentro de la misma cepa dependiendo de la fase de la curva de crecimiento en que se encuentre el cultivo. La sustancia capsular es antigenética, reacciona con anticuerpos específicos para producir una reacción de microprecipitación que, al alterar su índice de refracción la hace más fácilmente observable, este fenómeno es conocido como reacción de "Quellung" y va acompañado en algunos casos, por un aumento en el volumen de la cápsula⁴⁰.

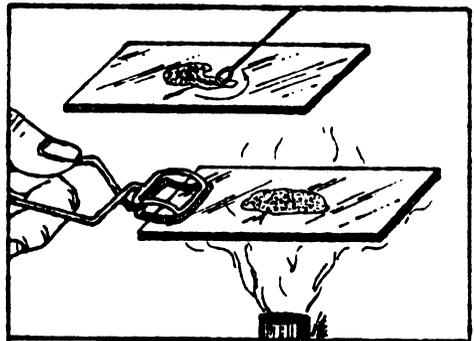
La tinción para cápsula puede ser diagnóstica, como en el caso de infecciones por Cryptococcus neoformans en extensiones de líquido cefalorraquídeo.

Generalmente la cápsula se pone de manifiesto mediante una tinción negativa o una modificación de ella, ya que por las técnicas usuales, no pueden observarse al no retener los colorantes utilizados³⁴. La tinta china o la tinta pelicano son útiles para realizar la técnica (el fondo está integrado por partículas, no es homogéneo y por esta razón muchos laboratoristas prefieren usar solución de nigrosina al 10%)^{33, 56}.

b.1 TINCIÓN DE CÁPSULA CON NIGROSINA^{33, 54}.
(Preparación seca) (1951).

2. PROCEDIMIENTO:

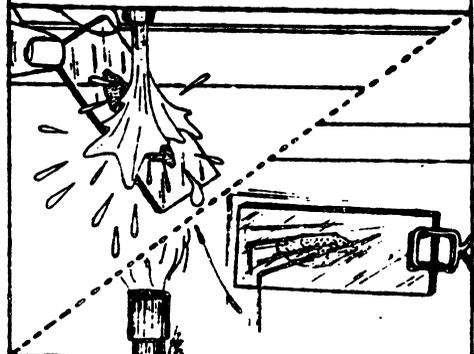
- Preparar una extensión delgada con la muestra y fijarla mediante calor.



- Teñir con safranina al 0.5% por espacio de 30 segundos.



- Lavar con agua corriente y escurrir, secar cerca del mechero.



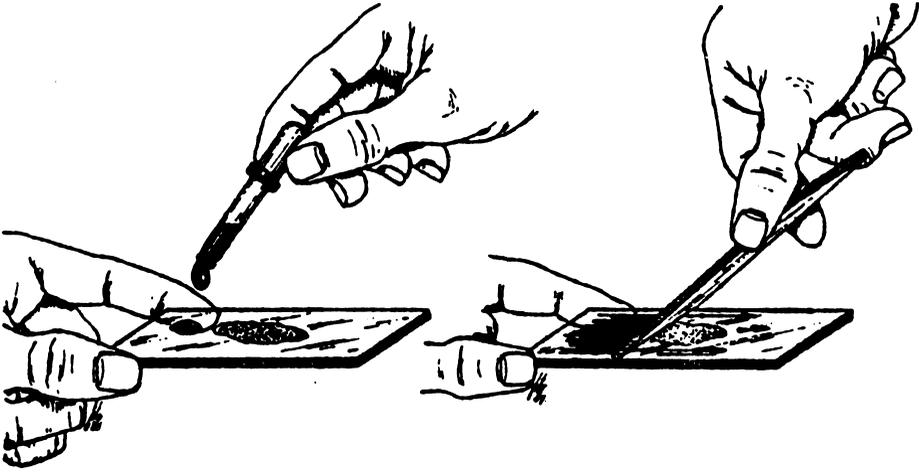


Fig. 2.4 Frotis con nigrosina para cápsula.

- Se esparce la nigrosina sobre la laminilla, utilizando la técnica para frotis sanguíneo (Ver Fig. 2.4).
- Dejar secar la extensión a medio ambiente, y observar.

3. RESULTADOS:

Las cápsulas se observan incolores sobre un fondo obscuro, el cuerpo bacteriano se tiñe de color rojo (Ver Fig. 2.5)

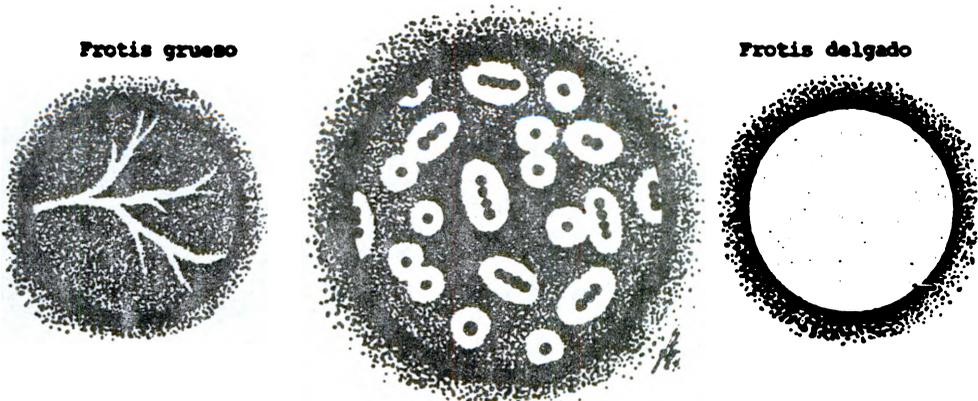


Fig. 2.5 Demostración de cápsulas utilizando el método de la nigrosina.

b.2 METODO DE MUIR PARA CAPSULA¹⁹

1. SOLUCIONES:

- Acido tánico 2 volúmenes
- Solución saturada de cloruro de mercurio 2 volúmenes
- Solución acuosa saturada de sulfato aluminicopotásico 2 volúmenes

2. PROCEDIMIENTO:

- Preparar una extensión delgada y uniforme del cultivo, fixar la mediante calor y cubrir la película con papel filtro.
- Teñir con fucsina fenicada durante 60 segundos y calentar hasta la formación de vapor.
- Lavar con alcohol, luego con agua corriente.
- Aplíquese mordiente durante 30 segundos.
- Lavar con agua corriente.
- Contrastar con Azul de metileno durante 30 segundos.

3. RESULTADOS:

Las células se tiñen de rojo y las cápsulas de azul.

C. TINCIÓN DE FLAGELOS

Los flagelos son estructuras demasiado finas (12 a 30 nm de diámetro) para ser visibles en el microscopio óptico, sin embargo, si se tratan con suspensiones coloidales inestables de sales de ácido tánico, puede ponerse de manifiesto su presencia y disposición en las células por medio de la formación de un precipitado grueso que se deposita sobre la pared celular y de los flagelos; en esta forma

el diámetro aparente de estas estructuras aumenta de tal modo, que una tinción subsecuente con fucsina básica las hace visibles en el microscopio³⁴.

En las bacterias perfrícticas los flagelos se agrupan en forma de haces durante el movimiento, y éstos pueden ser suficientemente gruesos como para ser observados, estudiando las células vivas mediante microscopía de campo oscuro o de contraste de fase, la tinción de flagelos puede realizarse, utilizando el método de Leifson (1960)^{11, 34}.

c.1 METODO DE LEIFSON PARA LA COLORACION DE FLAGELOS

1. SOLUCIONES:

- $(SO_4)_2$ ALK 12 H₂O
Solución saturada acuosa 20 ml.
- Acido tánico (sol. acuosa al 20%) 10 ml.
- Agua destilada 40 ml.
- Alcohol etílico al 95% 15 ml.
- Fucsina básica (sol. saturada en alcohol al 95%) 3 ml.

La tinción de flagelos no debe de tomarse a la ligera, pero resultados razonablemente satisfactorios pueden obtenerse cuando se tiene cuidado en la preparación del cultivo, del frotis y de los reactivos¹⁸.

2. PROCEDIMIENTO:

- Preparar las laminillas limpiéndolas en una solución de dicromato o ácido nítrico caliente perfectamente, lavar en agua, enjuagar en alcohol y secar.
- Preparar un frotis colocando una asada de bacterias, cultivadas en medio líquido, cerca de un extremo de la laminilla seca, la cual inmediatamente se inclina a una posición vertical, de tal manera que la gota se deslice dejando una película delgada con los bordes paralelos, la extensión puede realizarse utilizando el asa de inoculación como se muestra en Fig. 2.6^{10, 18, 33}.

Fig. 2.6 Preparación de frotis delgado para tinción de flagelos.

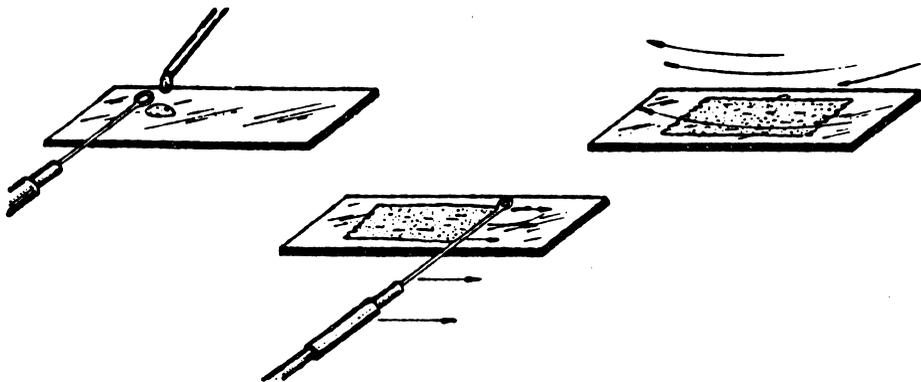
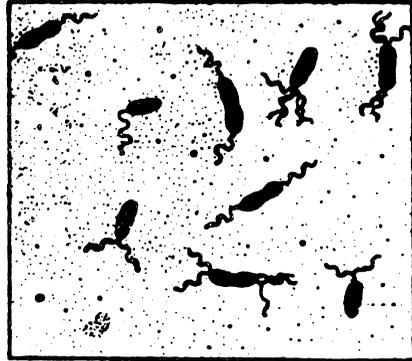


Fig. 2.7 Demostración de flagelos utilizando el método de Leifson. (Jawetz y Melnick, 1983).



- Una vez que la laminilla se ha secado, a temperatura ambiente, se inunda con la solución dejando reposar durante 10 minutos.
- Lavar perfectamente con agua corriente.
- Secar y examinar.

3. RESULTADOS

Los flagelos se tiñen bien, de color rojo, en aquellas bacterias que no presentan flagelos extremadamente delicados (Ver Fig. 2.7). Los flagelos pueden presentar diferente disposición, dependiendo el género bacteriano (Ver Fig. 2.8).

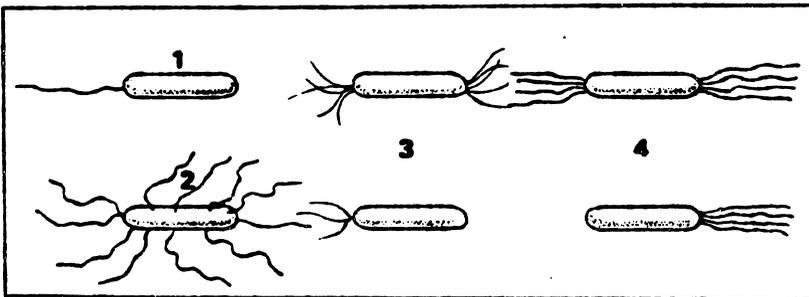


Fig. 2.8 Situación de los flagelos: 1. Monótricos, 2. peritricos, 3. multítricos y 4. lofotricos. (Carpenter, 1979).

b. TINCION DE ESPIROQUETAS^{11, 19}.
(METODO DE FONTANA, 1912)

1. SOLUCION:

. NITRATO DE PLATA AMONICAL:

- Disolver 5 g. de NO_3Ag en 100 ml. de agua destilada, retirar unos mililitros y añadir al resto una solución concentrada de amoníaco. gota a gota, hasta que el precipitado que se forma se disuelva; añadir luego gota a gota suficiente cantidad de nitrato de plata hasta que el reactivo permanezca ligeramente turbio aún después de agitar, la solución se conserva en buenas condiciones durante meses.

2. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la extensión y fijarla por calor.
- Verter encima una solución de ácido tánico al 5% en fenol al 1% y permitir que se evapore durante 30 segundos
- Lavar durante 30 segundos con agua corriente.
- Cubrir con una gota del nitrato de plata amoniacal antes citado, calentar cuidadosamente encima de una llama y dejar reposar durante 20 a 30 segundos después de comenzar la evaporación.
- Lavar perfectamente con agua.
- Escurrir o secar con papel secante y examinar.

3. RESULTADOS:

Las espiroquetas se tiñen de marrón o de negro en un campo marrón oscuro.

A menos que se haga una preparación permanente, la extensión se desintegra después de una semana.

3.5 TECNICAS AUTOMATIZADAS DE TINCIÓN

Cremer publicó en 1968 una valoración de las ventajas prácticas del uso de una máquina para la tinción estandarizada de laminillas teñidas por el método de Gram demostró que en la práctica la transferencia de bacterias de laminilla a laminilla en el interior de los frascos de tinción no ocurría. El obstáculo principal para su empleo es la renuencia de valorar los méritos de una máquina para algo tan simple como la tinción de Gram.

El valor de la máquina consiste en que los lotes de laminillas pueden ser preparadas con mayor rapidez que si se prepararan en forma individual y con un buen grado de precisión.

La máquina también puede ejecutar perfectamente bien el método de Auramina - fenol para la tinción de microorganismos pertenecientes al género Mycobacterium, empleando un microscopio fluorescente para examinar las laminillas³³.

B. AISLAMIENTO

La etapa de aislamiento consiste en el transporte y cambio de los microorganismos del medio natural donde se encuentran a un medio artificial (medios de cultivo y animales se experimentación) para su propagación en cultivo puro³².

Ventajas;

- Prerrequisito indispensable para la identificación de los agentes microbianos, salvo algunas excepciones.
- Requerido para una determinación correcta de la sensibilidad a los agentes antibióticos y sulfas.

Desventajas:

- Requiere de tiempo, equipo, conocimientos y experiencia.
- Puede ser peligroso para el personal de laboratorio.
- En algunas ocasiones se puede llegar al diagnóstico con técnicas menos laboriosas como: examen clínico, patológico, demostración, etc.

Métodos:

- Obtener una muestra del material biológico en condiciones estériles y sembrar en estría, con objeto de aislar los microorganismos en cultivo puro (ver técnicas de sembrado para obtención de cultivos puros).
- Si se sospecha de contaminación de la muestra, se recomiendan los siguientes procedimientos para reducir al máximo la posible contaminación: esterilización de la superficie de los órganos con una espátula caliente, centrifugación diferencial, filtración o bien, siembra en medios selectivos.

1. MEDIOS DE CULTIVO

Prácticamente todos los microorganismos, pero en particular las bacterias y los hongos, pueden cultivarse sobre sustratos nutritivos para el estudio de sus propiedades o para la utilización de ciertas propiedades en condiciones controladas.

Ya que los diversos microorganismos exigen requisitos diversos al medio de cultivo, se necesitan en el laboratorio microbiológico una serie completa de medios de cultivo especiales⁴³.

La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físicos como la temperatura, el pH, el factor redox, etc.

Para su crecimiento todos los microorganismos requieren agua, además deben estar presentes en forma utilizable el carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo y el hierro, muchos microorganismos dependen además de oligoelementos como el manganeso, molibdeno, zinc, cobre, etc.

Los microorganismos exigentes tienen necesidad además de factores de crecimiento como los aminoácidos, vitaminas, purinas u otras sustancias que no pueden sintetizar ellos mismos⁴³.

El carbono se necesita en la mayor parte de las veces en forma de compuestos orgánicos, que luego sirven como fuente de energía, el oxígeno se toma principalmente de la atmósfera, las necesidades de hidrógeno se cubren con compuestos orgánicos y, en casos particulares, también a partir de compuestos inorgánicos. El nitrógeno proviene de sales en forma de nitratos, nitritos o compuestos amónicos, o de componentes más complejos como aminoácidos, peptonas o proteínas. Los otros elementos se toman principalmente de sales.

Los medios de cultivo sintéticos están compuestos de una serie de sustancias químicas definidas exactamente, los medios de cultivo complejos contienen diferentes extractos, hidrolizados u otros aditivos⁴³.

Para la producción de medios de cultivo sólidos, se añade un agente de solidificación a las soluciones nutritivas líquidas. El agar - agar es un agente de solidificación prácticamente ideal, funde a temperaturas superiores a 90° C, pero al enfriar permanece líquido hasta una temperatura de aproximadamente 40° C.

El agar - agar es un extracto seco, gelificante, obtenido de algunas especies marinas de algas rojas, particularmente de los géneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* y *Adanthopeltis*⁸.

En el medio de cultivo pueden estar presentes colorantes e indicadores, cuyo cambio de color será característico para un determinado intervalo de pH, (Ver cuadro 2.4).

Los colorantes e indicadores son de importancia capital en la preparación de la mayor parte de los medios de cultivo diferenciales, en tales medios los colorantes pueden actuar de la siguiente manera:

a) Como agentes bacteriostáticos, o como agentes inhibidores que impiden o detienen el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos comensales que restringen, o impiden el crecimiento del germen o germenos que nos interesa aislar. b) Como indicadores de los cambios de acidez o de alcalinidad que experimenta el medio de cultivo (substrato). c) Como indicadores redox en ciertos medios de cultivo especiales, el azul de metileno y la resazurina son los indicadores redox más utilizados por su color indican la presencia o ausencia de oxígeno en algunos de los medios utilizados en bacteriología anaerobia^{8, 18, 43}.

CUADRO 2.4

Indicadores del pH y sus características

INDICADORES	[] usual %	Cambio de color	
		Acido	Alcalino
Rojo de metilo	0.2	4.2 - rojo	6.3 - amarillo
Rojo de clorofenol	0.2	4.8 - amarillo	6.4 - púrpura
Andrade	-	5.0 - rosa	8.0 - amarillo
Púrpura de bromocresol	0.2	5.2 - amarillo	6.8 - púrpura
Azul de bromotimol	0.2	6.0 - amarillo	7.7 - azul
Rojo neutro	0.1	6.8 - rojo	8.0 - amarillo
Rojo de fenol	0.2	6.8 - amarillo	8.4 - rojo
Rojo de cresol	0.2	7.2 - amarillo	8.8 - rojo
Azul de timol	0.2	8.0 - amarillo	9.6 - azul
Fenolftaleina	0.1	8.3 - incoloro	10.0 - rojo
Azul de china	-	4.8 - azul	6.8 - incoloro
Azul de timol (ácido)		1.2 - rojo	2.8 - amarillo
Naranja de metilo		3.1 - rojo	4.4 - amarillo
Azul de bromofenol		3.1 - amarillo	4.7 - azul
Rojo de congo		3.0 - azul	5.2 - rojo
Verde de bromocresol		3.1 - amarillo	4.7 - azul
Resazurina		3.8 - naranja	6.5 - violeta
Tornasol	-	4.5 - rojo	8.3 - azul

(Cowan y Steel, 1979)

(Branson D., 1972)

(Medios de cultivo Merck, 1983)

(Bauer y Ackerman, 1974)

1.1 CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Como es lógico suponer no todos los medios de cultivo son utilizados para el aislamiento de todas las cepas bacterianas, en ocasiones no sólo no son aptos para el aislamiento de microorganismos en general, sino que además poseen la capacidad de inhibir a algunos y favorecer el desarrollo de otros⁴⁰.

Basados en el propósito para el cual son fabricados los medios de cultivo, se pueden clasificar de la siguiente manera:

a. MEDIOS DE CULTIVO BASICOS

Son medios simples que contienen en general los nutrientes esenciales para promover el desarrollo de microorganismos poco exigentes nutricionalmente, reciben también el nombre de medios generales y pueden ser utilizados en análisis cuantitativos, para muestreos de medio ambiente y superficies y para conservar cepas con este tipo de medio.

Ejemplos: caldo nutritivo, agar nutritivo, caldo tioglicolado, caldo triptosa y agar tripticasa soya entre otros.

b. MEDIOS ENRIQUECIDOS

Son medios que han sido suplementados con otros nutrientes que proporcionan "factores de crecimiento" y cuya finalidad es promover el desarrollo de microorganismos más exigentes.

Ejemplos: agar sangre, agar chocolate, agar suero, agar glicerol y en general todos aquellos medios adicionados con plasma, líquido ascítico, vitaminas y aminoácidos.

c. MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Son muy utilizados, sobre todo en los cultivos entéricos, estos medios están concebidos para aumentar la propagación de ciertos organismos sin favorecer a otros.

Estos medios son muy eficaces en el aislamiento de Salmonella a partir de heces.

Ejemplos: caldo selenito de sodio, caldo selenito y cistina, caldo tetracionato, caldo-sal-colistina, agar sangre + levadura de cerveza, agar yema de huevo + leche, etc.¹⁸

d. MEDIOS SELECTIVOS

Son muy utilizados cuando se trabaja con muestras que provienen de áreas del cuerpo que poseen una flora normal abundante (faringe, boca, piel, nariz, vagina, etc.). En estos se incorporan sustancias inhibitoras de la propagación de un grupo de bacterias, pero permiten en cambio el crecimiento de otros grupos. Así, para el cultivo entérico, los medios usados de modo habitual contiene ciertos colorantes e ingredientes que inhiben los organismos Gram positivos y permiten la propagación de los bacilos entéricos Gram negativos; si por el contrario, se desean aislar Enterococos o Staphylococcus en los estudios de intestino, pueden incorporarse, por ejemplo, ácido sódico al agar sangre, lo cual inhibe los bacilos Gram negativos (Ver cuadro 2.5)^{19, 56}.

CUADRO 2. 5

Compuestos inhibidores usados en medios selectivos

COMPUESTO	RELACION EN EL MEDIO	PARA AYUDAR AL AISLAMIENTO DE
Cristal violeta	1: 700.000	<u>Brucella</u>
Acetato de talio	1: 8.000	<u>PPLO y Streptococcus</u>
Azida sódica	1: 2.000	<u>Streptococcus</u>
Azida sódica	1: 1.000	<u>Erysipelothrix</u>
Verde brillante	1: 40.000	<u>Campylobacter fetus</u>
Verde brillante	1: 80.000	<u>Salmonella</u>
Telurito potásico	1: 10.000	<u>Listeria, Corynebacterium</u>
Hidrato de cloral	1: 1.000	Todos los patógenos
Estreptomycina y Kanamicina	100 mg/ml.	Anaerobios
5 - Fluorouracil	0.002%	<u>Leptospira</u>

FUENTE: Tomado de G. R. Carter, 1969. Jang, Biberstain, Barajas, 1974.

Debe recordarse que también se logra un efecto selectivo hacia cierto grupo de microorganismos simplemente variando la temperatura, el pH, atmósfera o adicionando algunos antibióticos como en el caso del medio de tripticasa soya agar + penicilina o bacitracina, utilizado en el aislamiento del género Brucella.

Otros ejemplos, serían: el medio de Lowenstein - Jensen, utilizado en el aislamiento de Micobacterias, el medio de Fletcher, útil para el aislamiento de Leptospira y el medio de agar sal y manitol utilizado en el aislamiento de Staphylococcus.

e. MEDIOS DIFERENCIALES

Este tipo de medios, debido a los componentes químicos e indicadores que contienen, permiten identificar con cierta facilidad algunos géneros o especies bacterianas por el aspecto característico que toman sus colonias (Ver cuadro 2.6). Muchos medios selectivos son también diferenciales⁴⁰.

CUADRO 2. 6

Aspecto de las colonias bacterianas en base a la fermentación de la lactosa.

MEDIO DE CULTIVO	LACTOSA (+)	LACTOSA (-)
Agar verde brillante	Verde - amarillenta	rosa - roja
Agar Mac conkey	Rosa - morada	Incoloras
Salmoella - Shigella	Rojas - Rosas	Incoloras
Agar ENDO	Rojas	Gris
Eosina azul de metileno	Café oscuro	Incoloras
Agar de sal y manitol	"halo amarillo" (S. aureus)	"halo rosa" (S. epidermidis)
Agar de Chapman - Stone	Amarillas	Blancas

FUENTE: Bioxon de México, 1984.

f. MEDIOS PARA EL ESTUDIO DE CARBOHIDRATOS

En los medios de cultivo, los carbohidratos y glucósidos son muy utilizados como fuente de energía por las bacterias, y particularmente, para diferenciar géneros

e identificar especies, se utiliza generalmente el agua peptonada como base para el estudio de los azúcares, las soluciones de carbohidratos empleados para estas pruebas, deben esterilizarse por filtración, ya que al calentarse (y sobre todo al sobrecalentamiento) los azúcares sufren varios fenómenos, como la hidrólisis de los azúcares complejos, la formación de productos de oxidación y reaccionar con algunos otros componentes de los medios de cultivo como aminoácidos.

La descomposición por calor de un carbohidrato se manifiesta porque baja el pH, o visiblemente, por el oscurecimiento (caramelización) de la solución⁸.

Ejemplos: medio basal OF de Hugh y Leifson, medio para MR - VP, y todos aquellos en los cuales se pruebe algún azúcar en particular (agua peptonada + glucosa, ma nitol, sucrosa, sorbitol, galactosa, etc.).

g. MEDIOS DE TRANSPORTE

Son medios utilizados en el envío de muestras al laboratorio, algunos contienen sustancias reductoras o nutrientes que permiten a los microorganismos conservar se viables hasta llegar al laboratorio.

Ejemplos: medio de transporte de Stuart, caldo tioglicolado, caldo nutritivo, y medio de Carry - Blair.

1.2 PREPARACION Y DISTRIBUCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los fundamentos de preparación, distribución y esterilización de los medios de cultivo son esencialmente iguales, utilizando las formas deshidratadas o bien añ diendo los distintos ingredientes por separado.

Casi todos los medios de cultivo utilizables se encuentran en el comercio en forma deshidratada, y se presentan en forma de polvo o de granulados; la forma granulada de los medios deshidratados representa un producto mejor respecto a la forma en polvo, la granulación asegura una distribución más uniforme de las diferentes sustancias, en particular de las sustancias activas presentes en cantidades pequeñas, otra ventaja reside en la homogenización más rápida y por consiguiente la disolución de los granulados en forma completa^{13, 43}.

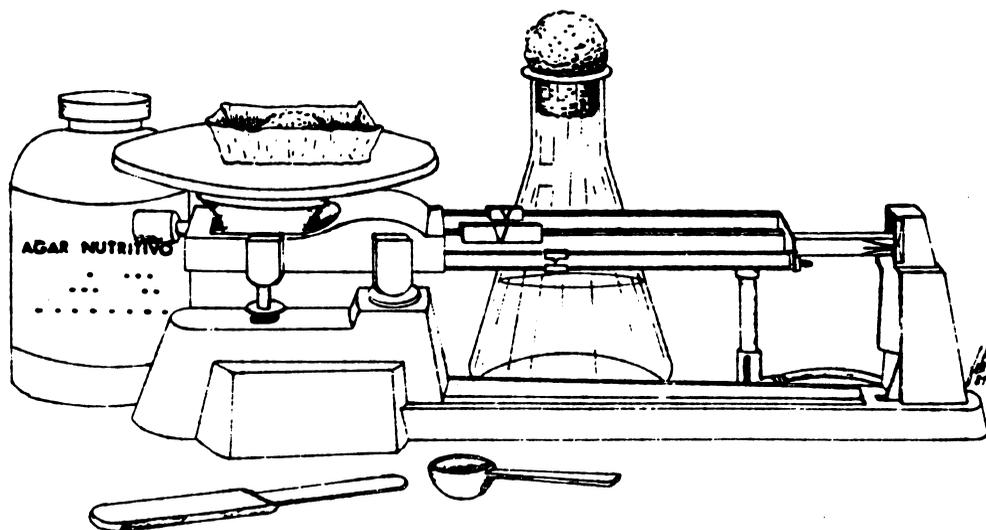
En la etiqueta de todos los frascos constan las instrucciones para reconstituir los medios deshidratados y se determinan simplemente la cantidad necesaria de polvo y se añade agua destilada, es importante utilizar un frasco o matraz Erlenmeyer lo suficientemente grande para que se puede remover o agitar bien para disolver el medio. Si se quiere hacer un litro de medio, por ejemplo, es conveniente emplear un frasco de dos litros, si el medio no contiene agar, tal vez se disuelva sin calentar, pero todos los que contienen agar requieren calor para subir la temperatura a 100° C. aproximadamente, este calentamiento no debe hacerse nunca con una llama directa, porque existe el peligro de quemar el medio o romper el matraz, colóquese el matraz en baño María y muévase o agítese a intervalos frecuentes hasta que el agar se haya fundido; si se ven copos de agar, es evidente que éste no se ha fundido y hay que continuar calentando^{18, 19}.

Estos medios se distribuyen en recipientes adecuados mientras están todavía calientes, los métodos de distribución de los medios disueltos en cajas de Petri, tubos o frascos, dependen del tipo del medio y de la finalidad de su empleo.

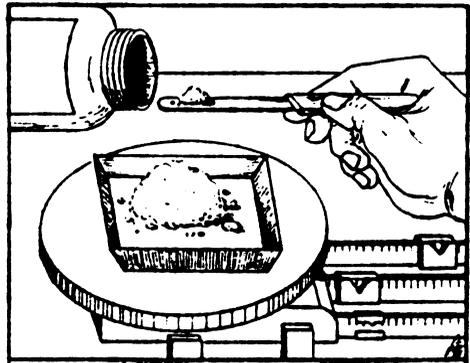
a. PREPARACION Y DISTRIBUCION DEL AGAR EN CAJA DE PETRI

Para preparar las placas de Petri, hay que esterilizar primero el medio en un matraz y a continuación verterlo en las cajas estériles hasta una altura de 3 mm. antes de verter el agar fundido en las cajas de Petri hay que dejarlo enfriar a unos 50 - 55° C. para prevenir la condensación de humedad en las paredes del recipiente¹³ (Ver secuencia página siguiente del Método de Reconstrucción para un medio con agar).

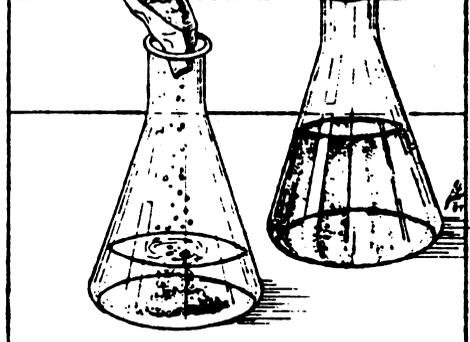
Fig. 2.9 Material necesario para la reconstrucción de los medios de cultivo.



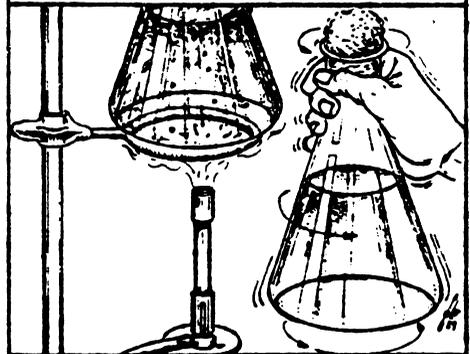
- Pesar la cantidad requerida del medio deshidratado utilizando una canastilla de plástico o aluminio, evitando con este pérdidas del polvo sobre la báscula.



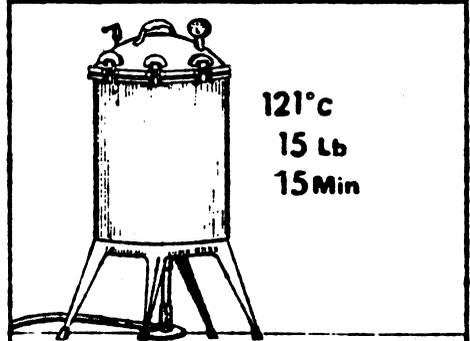
- El medio, se añade a una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada fría, y se distribuye uniformemente por agitación, seguidamente se añade la cantidad restante de agua y se homogeniza.



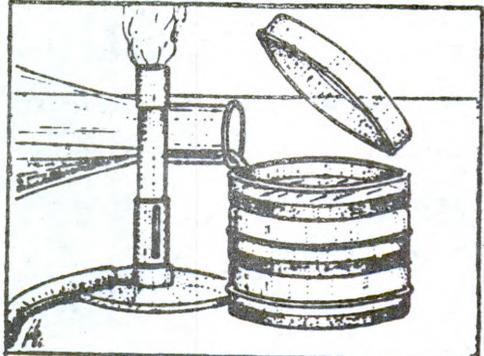
- Se deja reposar la solución durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, para que el agar pueda hincharse. Para disolver completamente los medios deben calentarse a más de 95° C.



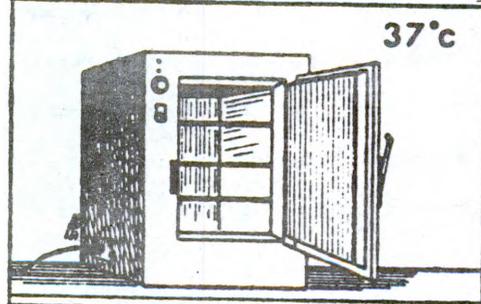
- Los medios de cultivo clarificados, se esterilizan en autoclave utilizando la forma convencional de 121° C. 15 lb - 15', estas constantes van a depender del tipo de medio a esterilizar.



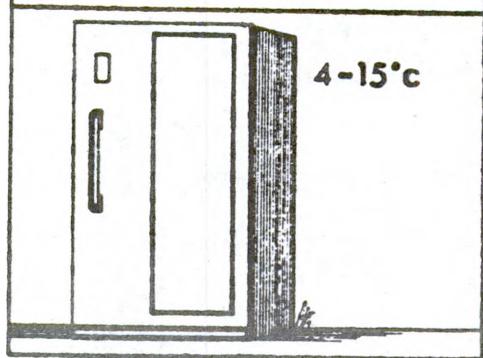
- El medio agarificado, todavía líquido se vierte en las cajas de Petri. El volumen es variable y depende del tamaño de las cajas; se recomiendan 15 a 20 ml. para las cajas de 3 1/2 plg. y de 20 a 35 ml. para las cajas de 4 plg.¹⁸



- Si aparecen burbujas de aire en las cajas, se eliminan pasando la llama del mechero de Bunsen por la superficie. Las cajas se pasan por una prueba de esterilidad que consiste en incubarlas por 24 horas a 37° C.



- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las cajas y los tubos son revisadas. Aquellas que muestren contaminación se desechan; por el contrario, las libres de contaminación se refrigeran entre 4 - 15° C hasta su utilización.



b. PREPARACION DE AGAR SANGRE Y AGAR CHOCOLATE

Los medios que contienen sangre total son los que más se emplean en el laboratorio de diagnóstico. El tipo de sangre, el agar base y la técnica empleada para la preparación son factores muy importantes para que se consiga un aislamiento adecuado de los microorganismos¹⁹.

El tipo de sangre utilizada en la elaboración de estos medios, es en ocasiones, un asunto de conveniencia y depende de los animales con que se disponga en el laboratorio, cuando se adquiere de una fuente comercial, por lo general se utiliza sangre de caballo, pero puede ser empleada la sangre de otras especies (hombre, cabra, bovino, conejo, oveja). El conservador utilizado durante la obtención de sangre varía dependiendo el propósito de su utilización en el medio de cultivo, se ha mencionado, por ejemplo, que el citrato de sodio es inhibitorio para los estafilococos (Rammell, 1962) y el Liquoid, para los cocos anaerobios (Holdeman y Moore, 1972)¹⁸.

En la mayoría de los laboratorios, se prefiere la sangre desfibrinada, la cual se toma en condiciones de esterilidad, en frascos de sangría que contienen perlas de vidrio para la separación de la fibrina, ésta debe ser relativamente fresca y no ser utilizada cuando la hemólisis es evidente, la sangre deberá almacenarse en refrigeración y no ser congelada¹⁶.

b.1 AGAR SANGRE

Para preparar agar sangre, se esteriliza la base de agar sangre contenida en un matraz, y luego se enfría a 50 - 55° C, posteriormente se añade la sangre al agar derretido en una cantidad de 5 - 10% y se mezcla concienzudamente haciendo

rotar el frasco, una vez hecha la mezcla se vierte en cajas de Petri previamente esterilizadas hasta una profundidad de 3 - 6 mm. Esta profundidad tiene considerable importancia, puesto que con frecuencia interesa comprobar la presencia o ausencia de hemólisis; si la capa de agar es demasiado gruesa puede pasarse por alto la hemólisis. Brown (1919) estudió las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de Streptococcus en placas de agar sangre y dió nombres a los tipos de hemólisis: Alfa (α), zona verde, las envolturas celulares intactas; Beta (β), zona clara, incolora, las envolturas celulares disueltas y Gamma (γ), ninguna acción sobre los glóbulos rojos. Los Staphylococcus se comportan en forma diferente en las placas preparadas con sangre de diversas especies y es confuso hablar de Staphylococcus hemolíticos porque la hemólisis puede deberse a una hemolisina o a una enzima lipolítica (Orcutt y Howe, 1922), (Ver Fig. 2.10)¹⁸.



Fig. 2.10 Producción de B - hemólisis en un medio de agar sangre.

Algunas cepas de Clostridium, producen toxinas que son capaces de provocar hemólisis en el agar sangre, esta característica puede ser de gran ayuda para identificar las diferentes cepas de este microorganismo.

La actividad hemolítica de ciertos vibrios se considera que tiene valor distinto; con estos microorganismos no solamente es importante la especie de glóbulos rojos atacados sino que también debemos tomar en cuenta cuando el calcio es necesario o inhibe la hemólisis¹⁸.

El flameado sobre las cajas servidas es importante ya que si existen burbujas de aire, el medio se torna rugoso y en muchas ocasiones aparece contaminado después de la incubación.

Algunos técnicos prefieren colocar una capa de agar bacteriológico en el fondo de la caja y luego encima una capa fina de agar sangre al 10%, para facilitar la apreciación de hemólisis¹⁹.

b.2 AGAR CHOCOLATE

Para elaborar agar chocolate, el matraz que contiene el medio con la sangre añadida, se calienta a 70 - 80° C y se agita con suavidad hasta que haya tomado el auténtico color chocolate; otra forma de preparar el agar chocolate, consiste en adicionar la sangre en forma estéril cuando la base de agar ha salido del autoclave y presenta una temperatura aproximada a los 80 - 90° C, después hay que dejar enfriar el medio a 50 - 55° C. Si se desea, para todos los casos se pueden añadir suplementos como antibióticos, tales como bacitracina; vitaminas, levadura, etc., y se vierte en cajas de Petri como se mencionó anteriormente¹⁹.

c. DISTRIBUCION DEL MEDIO DE CULTIVO EN TUBOS

Los medios líquidos (por ejemplo, el caldo de infusión cerebro corazón) pueden servirse en los tubos con una pipeta automática o calibrada para soltar la cantidad de medio deseada, no es necesario emplear tubos esterilizados para este fin.

Para las preparaciones en tubo en plano inclinado (sólido), u horizontal (sólido o semisólido), el medio preparado se distribuye en los tubos de ensayo y se coloca en el autoclave en posición vertical¹³.

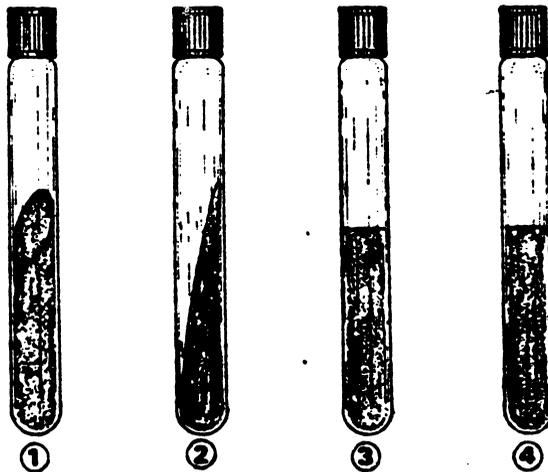


Fig. 2.11 Presentaciones del medio de cultivo en tubo:
1 y 2) agar sólido inclinado, 3) agar semisólido y 4) medio líquido.

Una vez esterilizado el medio se deja enfriar en posición inclinada en el extremo de la mesa, la cantidad de medio por tubo depende de la longitud e inclinación deseadas¹³ (Ver Fig. 2.11).

CUADRO 2. 7

PROBABLES CAUSAS DE ERROR EN LA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS.

F A L L A	CAUSA PROBABLE
1. Problemas de pH y cambios de color en el medio.	Sobrecalentamiento, mezclado inadecuado, exceso de tiempo en el autoclave, recipientes contaminados, agua destilada impura, hidrólisis de los ingredientes.
2. Solubilidad incompleta.	Calentamiento inadecuado, mezcla incompleta por lo que se sobrecalientan algunas porciones del medio, recipiente demasiado pequeño por lo que no es posible homogenizar el líquido.
3. Obscurecimiento.	Sobrecalentamiento al disolver el agar o al esterilizarlo.
4. Falta de dureza en el agar.	El agar no está en solución, mezclado ineficiente, pesado erróneo del polvo deshidratado, pH del medio demasiado ácido, exceso de inóculo en el agar por lo que éste quedará diluido. Por fundir el agar en varias ocasiones.
5. Pérdidas de las propiedades nutricionales o cambios en las características del crecimiento.	Por fundir el agar en varias ocasiones calentamiento prolongado o excesivo, mezcla inadecuada, material quemado en las paredes del recipiente, demasiado inóculo por ejemplo: adición de dextrosa, electrolitos, detergentes metales pesados, material protéico.

FUENTE: Bioxon de México, 1984.

2. TECNICAS DE SEMBRADO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

La mayoría de las bacterias pueden multiplicarse formando colonias visibles en medios de cultivo artificiales, originalmente la preparación de estos medios era laboriosa y sin estandarización de sus componentes, pero en la actualidad se cuentan con preparados comerciales que facilitan la elaboración de los medios y garantizan la estandarización de los ingredientes incluidos en ellos^{40, 43}.

Los medios de cultivo, una vez preparados y listos para ser inoculados con bacterias, pueden tener varias presentaciones en cuanto a su consistencia, la cual está determinada por la concentración de agar presente en el medio o la ausencia del mismo.

El agar, es un polisacárido ácido que proporciona geles bien formados y consistentes a la concentración usual de 1.0 a 1.5 por ciento, y que no licúa a la temperatura estándar de incubación (37° C), presentando además la ventaja de resistir la acción enzimática de las bacterias (Ver cuadro 2.8)⁸.

CUADRO 2.. 8

Concentración de agar (%) en medios para diferentes propósitos

TIPO DE MEDIO	JAPONES	NEO-ZELANDES	AMERICANO
MEDIO SOLIDO	1.5 - 2.0	1.0 - 1.2	1.5
MEDIO DURO	7.0	4.0	-
SEMISOLIDO	0.1 - 0.5	0.05 - 0.3	0.3 - 0.4
MEDIO LIQUIDO (sin agar)	-	0.05 - 0.3	-

FUENTE: Cowan y Steel, 1979.

El instrumento más utilizado del equipo de un laboratorio bacteriológico es el asa de inoculación, esta puede ser de alambre de platino, nicromo u otro material parecido el cual se inserta en un mango; también hay que disponer de un alambre recto para las inoculaciones por punción y para recoger las colonias aisladas de las cajas de Petri sembradas¹⁹.

Existen en el mercado asas microbiológicas calibradas para tomar un volumen constante de inóculo (Ver Fig. 2.12). Las asas calibradas más utilizadas con este fin son las de 0.01 y 0.001 ml, estas son utilizadas ampliamente para el análisis bacteriológico cuantitativo de agua y orina sin diluir¹⁹.

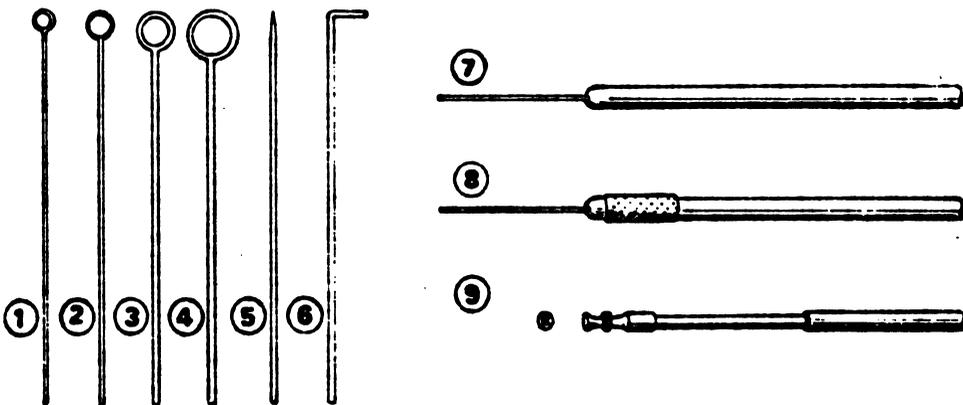


Fig. 1.12 Asas de inoculación utilizadas en el laboratorio de Microbiología: (1, 2, 3, y 4) asas calibradas para Bacteriología, (5) aguja de inoculación para medios semisólidos, (6) asa en forma de L utilizada en Micología, (7, 8 y 9) porta asas

FUENTE: Smith, A. L., 1977.

La inoculación de cada uno de los medios de cultivo, se realiza de manera diferente de acuerdo al fin que se persigue, el aislamiento de las bacterias de las muestras remitidas al laboratorio, se realiza casi siempre por sembrado en la superficie de una placa de agar en líneas paralelas por medio de un asa, este procedimiento asegura la suficiente dilución permitiendo el desarrollo de colonias aisladas que pueden emplearse para la obtención de "cultivos puros", en los que se pueda realizar la identificación^{7, 19}.

A partir del inóculo se realizan una serie de estrías en un cuadrante de la superficie del medio y esterilizando el asa, se realiza otra estría a partir de un extremo de la primera y así sucesivamente hasta completar cuatro series de estrías (Ver procedimiento página siguiente). El flameado del asa entre cada estría asegura la disminución del número de bacterias, lo cual permite el crecimiento aislado de las mismas¹⁵.

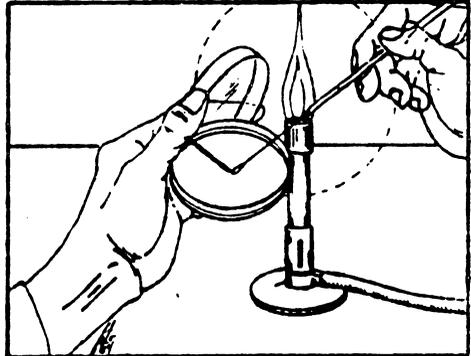
La mayor parte de estas colonias aisladas serán "cultivos puros" de un organismo y pueden recogerse para la próxima fase, la identificación; también las características de la colonia y la morfología celular ayudarán a la identificación final, por lo tanto, es indispensable que se emplee una técnica adecuada para la siembra^{5, 34} (Ver Fig. 2.13)

2.1 INOCULACION DE MEDIO SOLIDO EN CAJA DE PETRI

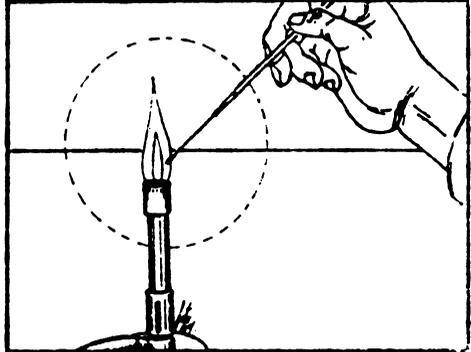
Para el aislamiento primario de bacterias, recomendamos la siguiente técnica:

PROCEDIMIENTO:

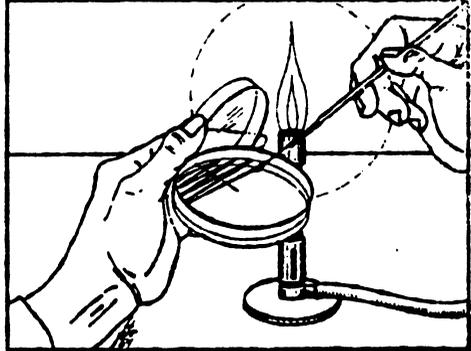
- Con un asa de inoculación esterilizada, se colocan 2 tomas del material cerca del borde de la placa, y se realiza una estría inicial.



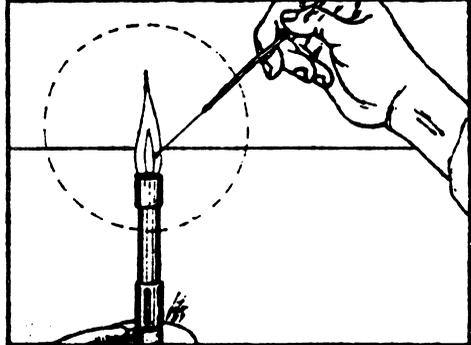
- Se esteriliza el asa en la llama y se deja enfriar. Se recomienda sumergir la en agua hirviendo antes de flamearla.



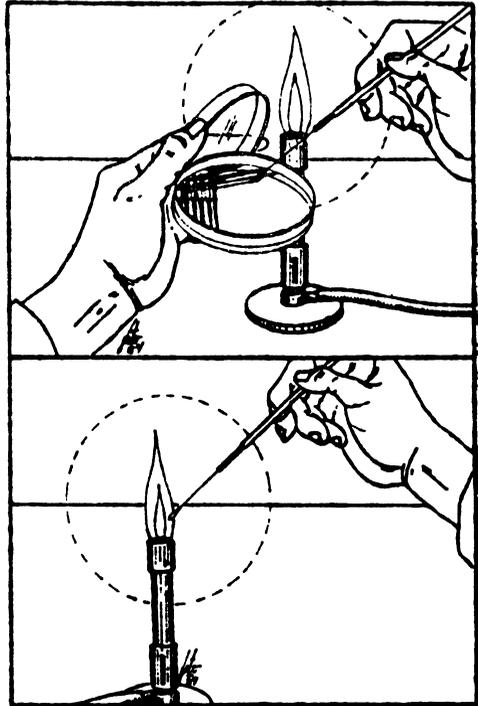
- Después, se emplea el asa para distribuir la muestra en la placa en estrías de la forma en que se indica en la figura, presionando ligeramente sin romper el agar.



- Recordemos que el asa de inoculación deberá esterilizarse entre cada cambio de estría utilizando la flama de un mechero de Bunsen.

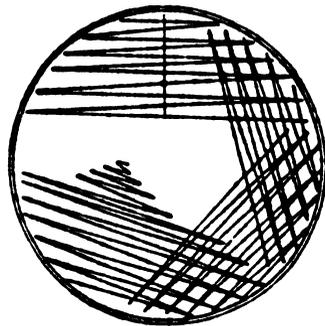


- A partir del extremo de la primer estría, se realiza una segunda y así sucesivamente hasta completar las cuatro estrías.



- Al concluir el sembrado en la placa, esterilizamos nuevamente el asa, evitando con esto, posibles contaminaciones a otros medios.

- Aspecto final de la placa sembrada utilizando la técnica descrita anteriormente.



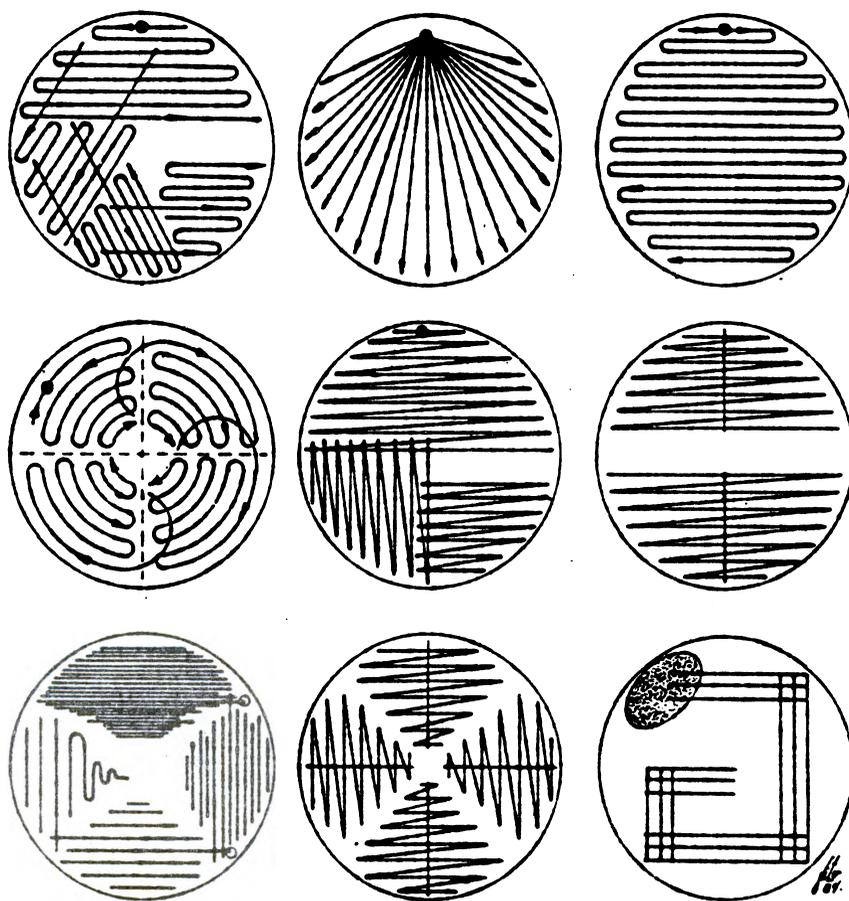


Fig. 2.13 Diferentes técnicas de "sembrado" que pueden ser utilizados como patrones en la obtención de cultivos puros.

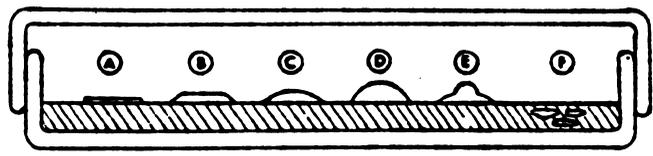
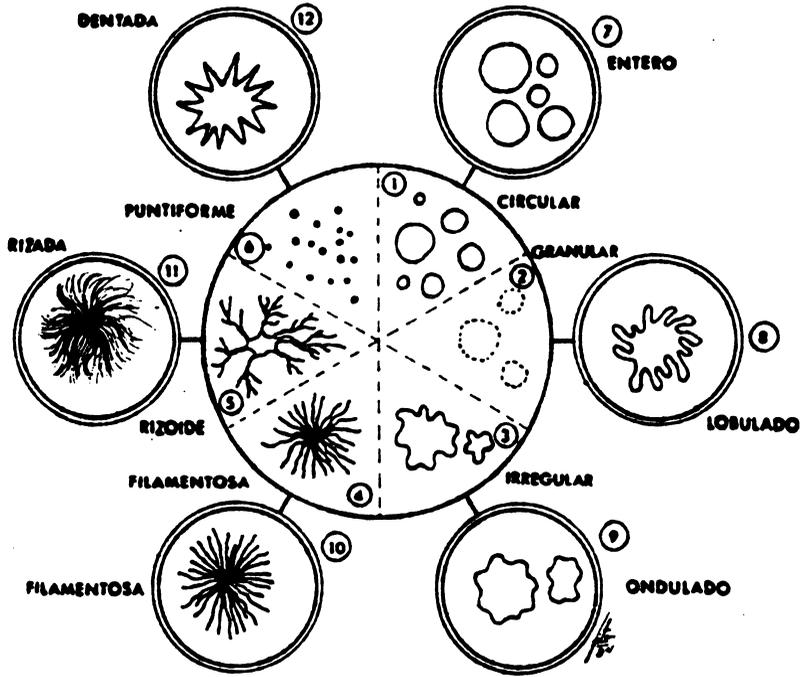
FUENTE: Smith, A. L., 1977; Jarvis J. D., 1976; Bauer y Ackerman, 1974.

Las placas una vez inoculadas se incuban en posición invertida con los medios hacia arriba a 37° C y se examinan a intervalos de 24 - 48 horas. Se pueden apreciar las diversas colonias, las cuales deberán ser examinadas con mucho cuidado (tomando en cuenta su morfología, borde, tamaño y color), tratando de encontrar alguna característica que nos pueda señalar el uso de alguna técnica especial ⁵² (Ver Fig. 2.14).

Después de que la placa ha sido incubada, y para la obtención de cultivos puros, cualquier colonia bien aislada es removida con un asa, pero tal vez sea más conveniente emplear un alambre recto para esto sobre todo si las colonias están muy juntas. La colonia es resuspendida en un medio líquido, o bien sembrada directamente en otra caja conteniendo algún medio específico dependiendo el agente que se sospecha.

Para ciertos tipos de muestras, por ejemplo, las de orina o sangre, se coloca una cantidad determinada de la muestra en una placa de Petri estéril y se vierte encima el agar derretido (enfriado a 50° C), luego se hace rotar la placa para mezclar minuciosamente el material con el medio. Una vez que se haya solidificado a temperatura ambiente, se invierte la placa, se incuba a 37° C y se examinan las colonias, esta técnica ofrece la ventaja de dar una determinación cuantitativa de las bacterias. Si las muestras están muy contaminadas, es necesario realizar una dilución ⁴⁰.

El resembrado de las colonias obtenidas en el aislamiento primario, asegura la purificación de las diversas cepas bacterianas y por lo tanto, la obtención de "cultivos puros".



A) PLANA, B) ELEVADA, C) CONVEXA, D) PULVINADA, E) UMBILICADA, F) BAJO LA SUPERFICIE

Fig. 2.14 Aspecto macrocópico que presentan las colonias bacterianas en cuanto a su forma, borde y elevación.

2.2 INOCULACION DE TUBOS CON AGAR INCLINADO

Los cultivos en una superficie de agar inclinado, se realizan con frecuencia para mantener las cepas puras, y para efectuar ciertos estudios bioquímicos²⁶.

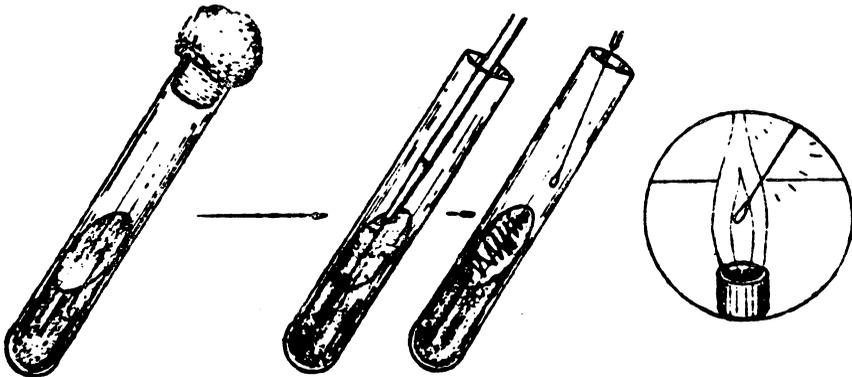


Fig. 2.15 "Sembrado" en agar inclinado.

La inoculación, se realiza a partir de una colonia aislada tomada de una placa. Con el asa, se traslada el inóculo a la superficie del medio que se siembra enteramente por estrías (Ver Fig. 2.15), a veces es necesario practicar una incisión en la superficie del agar, por ejemplo, en el agar TSI para organismos entéricos. la incisión nunca llega hasta el fondo¹⁹.

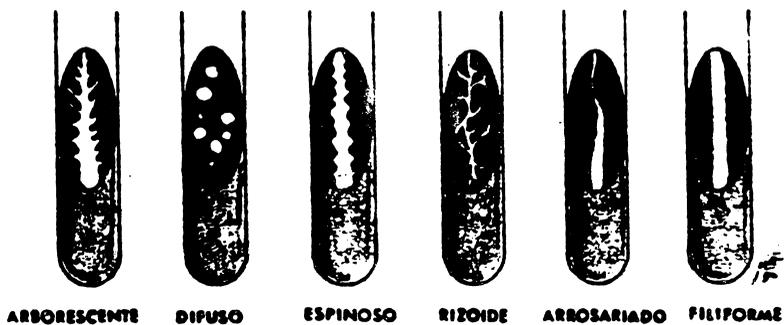


Fig. 2.16 Diferentes tipos de crecimiento sobre agar inclinado^{15, 54, 56}.

2.3 INOCULACIÓN DE TUBOS CON MEDIO SOLIDO HORIZONTAL

La inoculación de algún medio sólido presentado en tubo de ensayo con superficie horizontal, se realiza utilizando un alambre recto. El método de sembrado consiste en quitar la tapa del tubo con el dedo meñique, flamear la boca del tubo e inocular por picadura evitando llegar hasta el fondo del medio³³ (Ver Fig. 2.17).

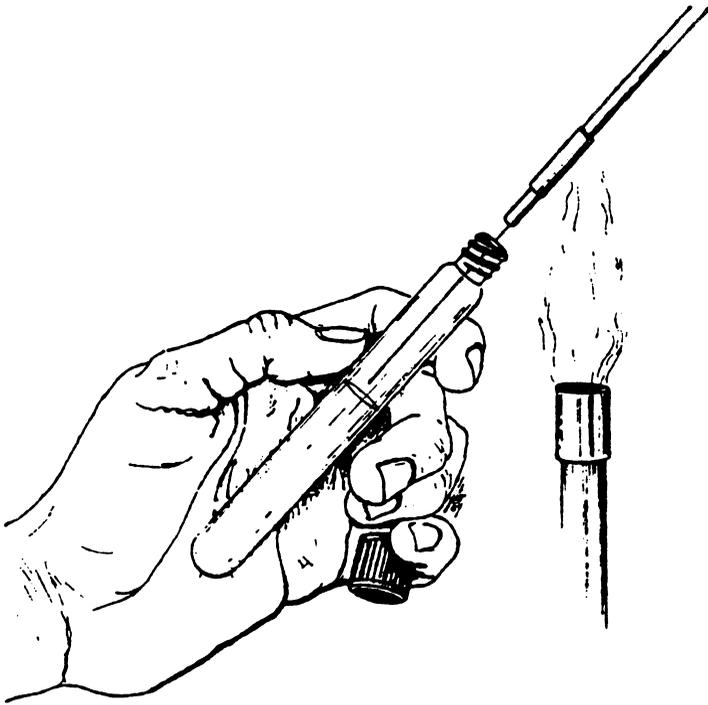


Fig. 2.17 Inoculación de un medio sólido por picadura.

2.4 INOCULACION DE MEDIOS SEMISOLIDOS

Los medios semisólidos se emplean para los estudios de movilidad (medio de SIM), carbohidratos (medio basal OF) o bioquímicos (gelatina). Se inoculan utilizando un alambre recto, tratando de que la incisión no llegue al fondo del tubo^{5, 19}

(Ver Fig. 2.18)

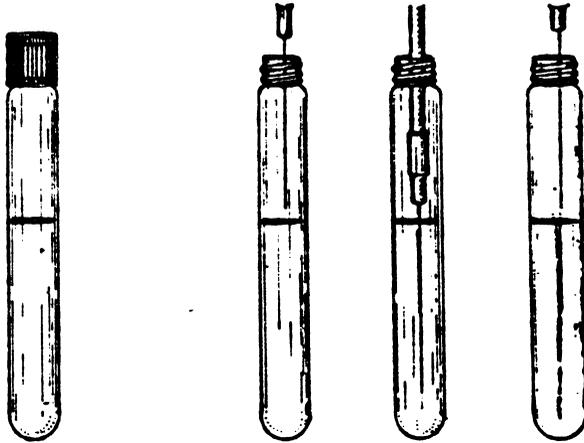


Fig. 2.18 "Sembrado" por picadura de un medio semisólido.

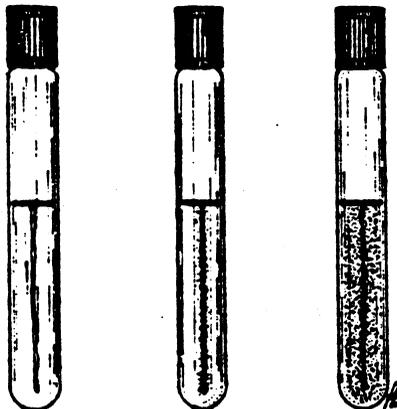


Fig. 2.19 Crecimiento bacteriano en el medio de SIM.

2.5 INOCULACION DE MEDIOS LIQUIDOS

La inoculación de los caldos de cultivo, se efectúa con un asa o con un alambre recto a partir de la muestra u otros cultivos, agitándola dentro del medio ¹⁹ (Ver Fig. 2.20).

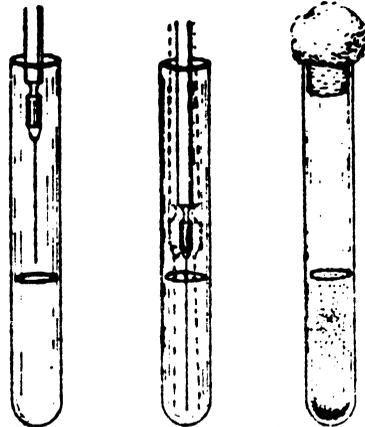


Fig. 2.20 Inoculación en medios líquidos.

El crecimiento en estos medios se manifiesta de tres formas:

1. Enturbiamiento: una opacidad más o menos densa.
2. Formación de velo: pequeña masa de células que flota en la parte superior del cultivo.
3. Sedimento: depósito celular que permanece en la parte inferior del cultivo ⁵⁴.

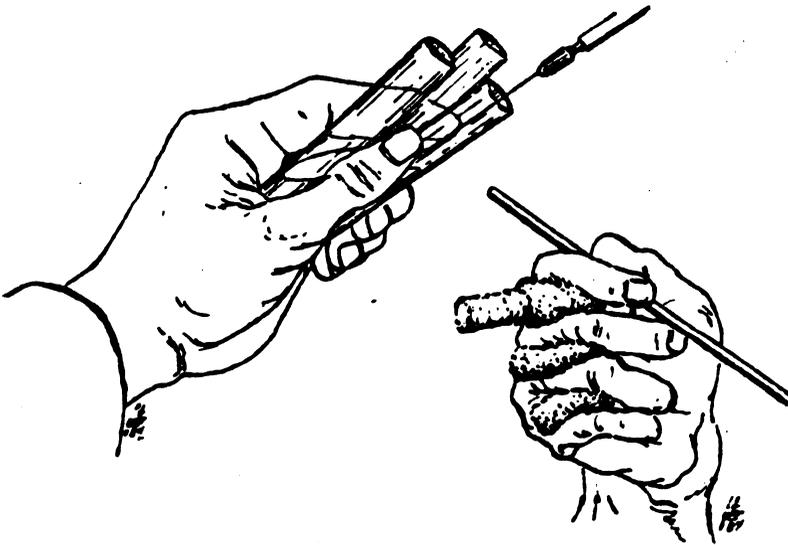


Fig. 2.21 Forma correcta de sostener los tubos y tapones durante la resiembra ⁵⁴.

OBSERVACIONES: Existen bacterias cuyas características de crecimiento (Proteus, por ejemplo) no permiten su aislamiento con facilidad para obtener cultivos puros en los medios sólidos, por lo que se hace necesario utilizar medios de cultivo duros (3 - 7% de agar) que por su consistencia inhiben el abundante crecimiento en la superficie del medio, obteniéndose con esto, colonias aisladas⁴⁰.

- Cuando se siembran especímenes líquidos, como sangre, líquido sinovial, etc., en medios de cultivo líquidos, se necesita que haya 10 veces más la cantidad de cultivo que material sembrado.
- Cuando se emplea caldo tioglicolato o el medio de Robertson para el aislamiento de anaerobios, deben calentarse durante 10 minutos en agua hirviendo para expulsar el oxígeno disuelto.
- Para conservar los cultivos durante breve tiempo, deberán emplearse caldos o superficies de agar inclinadas, ya que las cajas de Petri tienden a deshidratarse, a no ser que se cierren herméticamente con cinta de goma o plástico¹⁹.
- La conservación de cepas de un cultivo puro, tiene gran éxito cuando se realizan preparados liofilizados, o en su defecto, se congelan en caldos de cultivo.

CUADRO 2.9

CUADRO DE REFERENCIA PARA EL CULTIVO DE MUESTRAS EN BACTERIOLOGIA

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO PROBABLE	MORFOLOGIA Y REACCION AL GRAM	MEDIOS A UTILIZAR
Torunda nasal	Staphylococcus	C (+)	A, F, P,
	Streptococcus	C (+)	A, R,
	Pasteurella	B (-)	A
	Haemophilus	B (-)	A, K,
	Corynebacterium	B (+)	A
	Bordetella	B (-)	A, J
	E. coli	B (-)	C, D, Q
	Mycoplasma	FP (Giemsa)	S
Torunda de oido	Staphylococcus	C (+)	A, F, P
	Streptococcus	C (+)	A, R
	Proteus	B (-)	C, D, Q, E
	Pseudomona	B (-)	P, T
	Klebsiella	B (-)	C, D, E, L, Q
	Corynebacterium	B (+)	A
Torundas y líquido sinovial	Staph., Strep.	C (+)	A, F., P, R
	E. coli	B (-)	C, D, Q
	Erisipelotrix	B (+)	A, N
	Actinobacillus	B (-)	N, A, O
	Haemophilus	B (-)	A, K
	Mycoplasma	FP (Giemsa)	S
	Salmonella	B (-)	C, D, E, L
	Piel y músculo	Actinobacillus	B (-)
Clostridium		B (+)	A, N, O
Bacteroides		BP(-)	N, O
Actinomyces		BP(-)	A, N, O
Corynebacterium		B (+)	A
Staph., Strep.		C (+)	A, F, P, R
Pseudomona		B (-)	P, T
Dermatophilus		B (-)	A, N, O
Brucella		CB(-)	G, H, O, A

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO PROBABLE	MORFOLOGIA Y REACCION DE GRAM	MEDIOS A UTILIZAR
Pus, líquidos pleurales y peritoneales	Staph., Strep	C (+)	A, F, P, R
	Corynebacterium	B (+)	A
	Pasteurella	B (-)	A
	Actinobacillus	B (-)	N, A, O
	Actinomyces	BP(-)	N, A, O
	Haemophilus	B (-)	A, K,
	Pseudomona	B (-)	P, T
	Bacteroides	BP(-)	N, O
	Clostridium	B (+)	N, A, O
	Líquido cerebro-Espinal	Listeria	B (+)
Achromobacter		CB(-)	A, N
Haemophilus		B (-)	A, K
Staph., Strep.		C (+)	A, F, K, R
E. coli		B (-)	C, D, Q
Mycoplasma		FP(Giemsa)	S
Pulmón	Mycobacterium	B (+)	A, M
	Diplococcus	D (+)	A, K
	Bacteroides	BP(-)	N, O, A
	Mycoplasma	FP(Giemsa)	S
	Haemophilus	B (-)	A, K
	Pasteurella	B (-)	A
	Corynebacterium	B (+)	A
	Salmonella	B (-)	C, D, E, L
Hígado	Bacteroides	BP(-)	N, O, A
	Corynebacterium	B (+)	A
	Clostridium	B (+)	A, O, A
	Achromobacter	CB(-)	A, N
	Salmonella	B (-)	C, D, E, L
Riñón	Leptospira	E (Giemsa)	U
	E. coli	B (-)	C, D, Q
	Corynebacterium	B (+)	A
	Klebsiella	B (-)	Q, L, E

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO PROBABLE	MORFOLOGIA Y REACCION AL GRAM	MEDIOS A UTILIZAR
Sangre	<i>B. anthracis</i>	B (+)	A, N
	<i>Pasteurella</i>	B (-)	A
	<i>Yersinia</i>	B (-)	A, N, G
	<i>Coxiella</i>	BP(-)	A, N
	<i>Clostridium</i>	B (+)	A, N, O
	<i>Streptococcus</i>	C (+)	A, R, K
	<i>Salmonella</i>	B (-)	C, D, E, L
	<i>Erysipelotrix</i>	B (+)	A, N
	<i>E. coli</i>	B (-)	C, D, Q
Materia fecal	<i>Salmonella</i>	B (-)	D, D, E, L
	<i>Enterococcus</i>	C (-)	C, A, Q, L
	<i>E. coli</i>	B (-)	C, D, Q
	<i>Klebsiella</i>	B (-)	D, E, L
	<i>Proteus</i>	B (-)	C, D, Q, E
	<i>Mycobacterium</i>	B (+)	A, M
	<i>Vibrio</i>	BC(-)	I, L, K
	<i>Alcaligenes</i>	B (-)	C, E, E, Q
Orina	<i>E. coli</i>	B (-)	C, D, Q
	<i>Leptospira</i>	E (Giemsa)	U
	Staph., Strep.	C (+)	A, F, K
	<i>Corynebacterium</i>	B (+)	A
	<i>Actinobacillus</i>	B (-)	A, N
Leche	Staph., Strep.	C (+)	A, F, K, R, P
	<i>E. coli</i>	B (-)	A, D, E, Q
	<i>Klebsiella</i>	B (-)	C, D, E, L
	<i>Pseudomona</i>	B (-)	P, T
	<i>Brucella</i>	CB(-)	G, H, O, A
	<i>Mycobacterium</i>	B (+)	A, M
	<i>Mycoplasma</i>	FP(Giemsa)	S
Exudado ocular	<i>Haemophilus</i>	B (-)	A, K
	<i>Moraxella</i>	CB(-)	N, A
	<i>Neisseria</i>	D (-)	B, K, A
	<i>Mycoplasma</i>	FP(Giemsa)	S

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO PROBABLE	MORFOLOGIA Y REACCION AL GRAM	MEDIOS A UTILIZAR
Tracto genital y fetos	Brucella	CB(-)	G, H, O
	Vibrio	BC(-)	I, L, Q
	Leptospira	E (Giemsa)	U
	Salmonella	B (-)	C, D, E, L
	Campylobacter	E (Campo oscuro)	V, N
	E. coli	B (-)	C, D, Q
	Listeria	B (+)	G, A
	Corynebacterium	B (+)	A
	Staph., Strep.	C (+)	A, F, P, R, K

FUENTE: Osbaldiston, 1983; Jang, Biberstain Barajas, 1974; BIOXON de México, 1984.

MORFOLOGIA (ABREVIATURAS)

- C (+) . _ Coco - Gram positivo
- B (+) . _ Bacilo - Gram positivo
- C (-) . _ Coco - Gram negativo
- B (-) . _ Bacilo - Gram negativo
- CB(-) . _ Cocobacilo- Gram negativo
- BP(-) . _ Bacilo pleomorfico
- FP . _ Formas pleomorficas
- E . _ Espirilo
- BC(-) . _ Bacilo curvo - Gram negativo
- D (-) . _ Diplococo - Gram negativo

MEDIOS UTILIZADOS

- A.- Gelosa sangre
- B.- Agar chocolate
- C.- Agar Mac Conkey
- D.- Agar verde brillante
- E.- Agar Salmonella- Shigela
- f.- Agar para Staphilococcus 110
- G.- Agar biotriptasa
- H.- Agar Brucella
- I.- Agar TCBS (para Vibrios)
- J.- Agar de Bordet gengou
- K.- Agar de Casman
- L.- Caldo tetracionato
- M.- Medio de Lowenstein-Jensen
- N.- Caldo tioglicolato
- N.- Medio de Loeffler
- O.- Agar anaerobico
- P.- Agar nutritivo
- Q.- Agar tergitol 7
- R.- Agar Estreptosel
- S.- Agar PFLO, Medio Eaton
- T.- Agar de Sellers
- U.- Medio de Fletcher
- V.- Medio de agar de Florent

C. IDENTIFICACION

Ventajas

- Es la forma más convincente del diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas, mediante este procedimiento se determina el género y la especie bacteriana causante del problema.

Desventajas

- Requiere de tiempo, equipo, conocimiento y experiencia. El personal de la boratorio q' realice la identificación, debe tener un amplio conocimiento de los métodos y técnicas utilizados para cada género en particular.

- Puede ser peligroso para el personal inexperto en el área de diagnóstico microbiológico.

Métodos

- Existen tablas o cuadros bioquímicas en los cuales se comprueba el resultado de las reacciones y son la base en la identificación de los diferentes agentes bacterianos.

- Las pruebas biológicas pueden ser otra forma de identificación.

- Por medio de antisueros se determina específicamente el tipo de bacteria de que se trate (ejemplo, serotipificación de Salmonella spp., Brucella, etc.). Por otro lado, por medio de bacterias (antígeno) conocidas, es posible determinar la presencia, en la muestra (suero, orina, etc.), de los anticuerpos específicos al germen sospechoso (leptospirosis en orina, Brucelosis en suero o leche, etc.)³².

Para la identificación de las bacterias, el laboratorio de diagnóstico necesita conocer las características físicas y metabólicas de las mismas.

Dentro de las características físicas, se toman en cuenta: agrupación, reacción a la tinción de Gram y algunas otras particularidades estructurales que se pueden

apreciar con tinciones específicas, así como la morfología de las colonias observadas en las placas de agar.

Conocidas las características físicas del microorganismo, se analizan sus reacciones metabólicas tales como la producción de enzimas, metabolitos intermediarios, oxidación y fermentación entre otras. Esto se logra a través de pruebas estandarizadas que se elaboran a partir de preparados comerciales que son medios de cultivo conteniendo el compuesto sobre el cual las enzimas bacterianas actúan e indicadores que ponen de manifiesto la reacción que se llevó a cabo⁴⁰.

Al estudiar el metabolismo bacteriano en el laboratorio, podemos dar atención primero a la localización de la acción de las diferentes enzimas, la mayoría de las enzimas se encuentran en el interior de cada célula (endoenzimas); otro grupo de enzimas, no tan numerosas, se encuentran en el exterior de las células (exoenzimas), estas enzimas pueden actuar sobre las sustancias presentes en el medio ambiente de las bacterias¹⁰.

Cada enzima es una proteína y por lo tanto, se fabrica bajo control genético, si un organismo hidroliza el almidón, por ejemplo, se sabe que produce una enzima capaz de llevar a cabo esta hidrólisis, la cual sólo se sintetiza si el organismo cuenta con el gen adecuado. Incluso factores como la susceptibilidad a un anti-séptico o antibiótico se reducen a la herencia del organismo. La capacidad para utilizar las diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono es, igualmente, debida a la presencia o ausencia de una enzima (o enzimas) específica, la cual a su vez depende del material hereditario¹⁰.

Las pruebas de enzimas preformadas y el uso de substratos enzimáticos aislados ayudarán a acelerar la identificación de microorganismos. Una reciente introducción en el mercado, el sistema A.P.I. (Analytab Products Inc.- Productos Analíti-

cos Tabulados, S. A.) constituye un ejemplo, de la disponibilidad de un sistema de multipruebas por micrométodo para Enterobacteriaceae. Se introduce un inóculo de fase logarítmica (18-24h) del organismo a prueba en 20 aberturas, después de ser incubado toda la noche, se leen los resultados, algunas de las pruebas requieren la adición de reactivos, pero el método es rápido, económico en términos de tiempo, espacio y conveniencia y se afirma que es capaz de "diferenciar" enterobacterias con una precisión del 90 - 95% dependiendo del inóculo (Washington, Yu y Martin, 1971). Cualquier método adoptado, ya sea el tradicional o el moderno, hace incapie en la importancia de un cultivo puro³³.

Los métodos incluidos en este manual no son evidentemente los únicos recomendables, han sido empleados por algunos autores e investigadores responsables. Cada laboratorio puede hacer mejorar o modificar las técnicas recomendadas para acomodarlas mejor a cada situación particular, otras reacciones se encuentran en las publicaciones que se incluyen en la bibliografía¹⁹.

Las pruebas incluidas en este capítulo, son las siguientes:

1. PRUEBAS DE REACCION SIMPLE

- 1.1 Prueba de la catalasa
- 1.2 Prueba de motilidad
- 1.3 Prueba de la oxidasa
- 1.4 Prueba del ácido de la glucosa
- 1.5 Prueba de Oxido - Fermentación
- 1.6 Prueba del citrato
- 1.7 Prueba del malonato
- 1.8 Reacción de la ureasa
- 1.9 Prueba de reducción del nitrato
- 1.10 Prueba del Rojo de metilo - Voges Proskauer

2. PRUEBAS DE REACCION MULTIPLE

- 2.1 Pruebas en el medio de S.I.M.
- 2.2 Prueba de la leche con Tornasol
- 2.3 Prueba de la descarboxilación de la lisina
- 2.4 Pruebas en el medio T.S.I.

3. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

- 3.1 Prueba de CAMP
- 3.2 Requerimientos de factores X y V
- 3.3 Prueba de la coagulasa

De cada prueba se especifica: fundamento, bases bioquímicas, reactivos, medios empleados, procedimientos y los resultados negativos y positivos. En algunas de ellas se incluyen anotaciones que permiten hacer más comprensible cada técnica.

1. PRUEBAS DE REACCION SIMPLE

1.1 PRUEBA DE LA CATALASA

FUNDAMENTO:

comprobar la presencia de la catalasa, la cual es una enzima que desdobra el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.

BASES BIOQUIMICAS:

La enzima catalasa es una hemoproteína; el grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente por molécula, que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática. La enzima, se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo; ésta cataliza la rotura del agua oxigenada, liberando oxígeno⁴¹.



Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno (Dubos, 1965). Cuatro géneros que dan reacción negativa son : Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus y Clostridium⁵⁴.

REACTIVOS:

Peróxido de hidrógeno al 30% (superoxal) o al 3%. El reactivo se debe de conservar en un frasco ámbar; evitar la exposición a la luz.

NOTA: El peróxido es muy inestable y debe ser probado diariamente antes de su empleo.

El pH óptimo para observar la actividad de la catalasa es de 7.0 (Harrow, 1966); y los métodos más comunmente empleados son los siguientes¹¹:

PROCEDIMIENTOS

METODO DEL PORTAOBJETOS

- Con una aguja de inoculación, tomar una muestra de un cultivo puro de 18 a 24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio.

Cuando la colonia problema se encuentra cultivada en gelosa sangre, el asa no debe enfriarse en el espesor del medio, ni debe tocar la superficie del agar, ya que se observa una enérgica producción de burbujas y espuma debido a la presencia de catalasa en los eritrocitos⁴¹.

- Agregar una gota de $H_2 O_2$ al 30% (superoxal) sobre el organismo, usar un gotero o una pipeta Pasteur.
- No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos.
- No es necesario mezclar con la aguja o el asa de inoculación.

RESULTADO

Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de oxígeno), en la prueba positiva.

Negativa: no hay formación de burbujas.

TECNICA DEL CUBREOBJETOS. (Taylor y Achanzar, 1972).

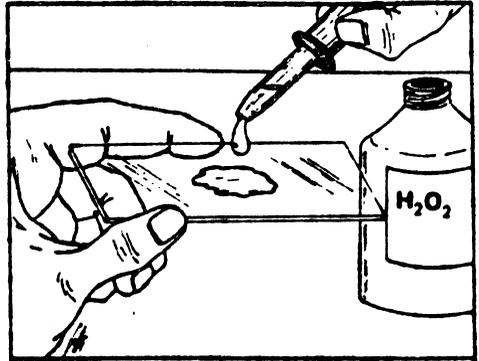
A una colonia aislada en una placa, agregar una gota del reactivo al 0.5% y cubrir con un cubreobjetos.

RESULTADO:

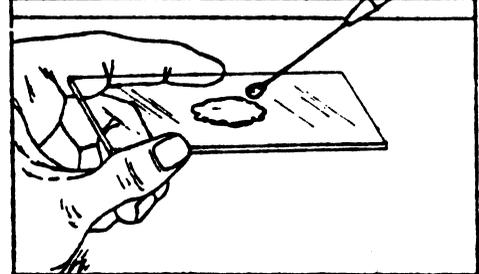
Observar la formación de burbujas en la reacción positiva.

METODO DEL PORTAOBJETOS

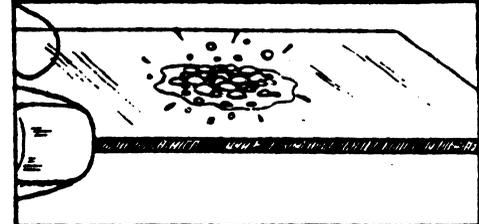
- Agregar una gota del reactivo al 30% sobre la colonia de microorganismos del portaobjetos. Usar un gotero o una pipeta Pasteur.



- Mezclar con el asa de inoculación suavemente. Por lo general, no es necesario mezclar el reactivo con el cultivo.



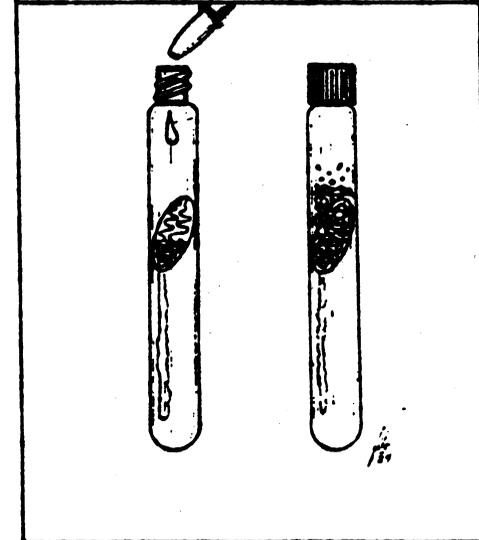
Se observa la inmediata formación de burbujas en una reacción positiva⁴¹.



METODO EN TUBO DE ENSAYO

- Agregar directamente 1 ml. de H₂ O₂ al 3% a un cultivo puro sembrado en una superficie de agar inclinado, densamente inoculado¹⁹.

RESULTADO:
Efervescencia inmediata en la reacción positiva.



Cuando la formación de aerosoles pueden ser peligrosos, como en el caso de Yersinia pestis, Burrows et. al. (1964) inocularon por picadura, agar conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.5%; la efervescencia se busca empleando el microscopio a bajo aumento; las burbujas de oxígeno persisten mucho tiempo y se reduce el peligro de los aerosoles si se agrega al agar un desinfectante reductor de la tensión superficial ¹⁸ (cetrimida al 0.5%).

Otros compuestos, aparte del peróxido de hidrógeno, que pueden ser sustratos utilizados por la catalasa, son: alcoholes (etanol), formaldehído hidratado, ácido nitroso, y ácido fórmico. También pueden usarse sustratos inespecíficos como las aminas aromáticas, fenoles y ácidos aromáticos ⁴¹ (Cantarow y Schepartz, 1968).

1.2 PRUEBA DE MOTILIDAD

FUNDAMENTO:

determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil.

Las bacterias tienen movimiento por medio de sus flagelos, que se encuentran por lo general, entre los bacilos; sin embargo algunas formas de cocos son móviles.

Las bacterias móviles pueden contener un sólo flagelo o muchos, y su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo ⁴¹.

El examen buscando bacterias móviles puede ser hecho en organismos vivos sin teñir, en donde puede observarse el patrón de crecimiento, teñir los flagelos o detectar los antígenos flagelares.

La motilidad puede ser estudiada por una preparación de "gota suspendida" u otro tipo de preparación húmeda (tubo capilar, utilizando un portaobjetos excavado, etc. ⁵¹).

PROCEDIMIENTO

METODO DE LA "GOTA SUSPENDIDA"

Es un método muy sencillo y satisfactorio que puede realizarse rutinariamente en cualquier laboratorio de bacteriología. En esta técnica deben guardarse precauciones excesivas ya que se trata de una gota colgante, la cual no tiene contacto alguno con el portaobjetos.

TECNICA:

Se utiliza un cubreobjetos con cuatro burbujas de vaselina sólida (algunos técnicos prefieren el uso de plastilina) en los extremos, se coloca una asada llena de organismos en la fase logarítmica sobre la mitad del cubreobjetos y se desciende un portaobjetos sobre ella, se invierte la preparación y se examina con los objetivos de 4 y 10 mm³³ (Ver Fig. 2.22)

Es importante que esté parcialmente cerrado el diafragma del microscopio ya que una iluminación demasiado brillante hace casi imposible la observación de los organismos. Por razones de seguridad, se recomienda el anillar el cubreobjetos por completo.

RESULTADOS

Prueba positiva: se aprecia un desplazamiento uniforme de los microorganismos.

Prueba negativa: sin desplazamiento, o movimiento Browniano, en el cual las células oscilan con ligereza debido al bombardeo molecular, también debe excluirse la falsa movilidad debida a corrientes de convección.

Exceptuando algunas cepas de Streptococcus faecalis en las concentraciones elevadas de proteínas, ningún coco de importancia médica es móvil.

Los anaerobios presentan problemas especiales en donde la motilidad puede ser inhibida por el aire en las preparaciones de "gota suspendida", es más probable que se observe la motilidad de los clostridios en las preparaciones de cultivos de carne cocida montados en tubos capilares cerrados en cada extremo utilizando algún sellador y examinarse nuevamente después de 30 minutos de incubación a 37° C¹⁸ (Ver Fig. 2.23).

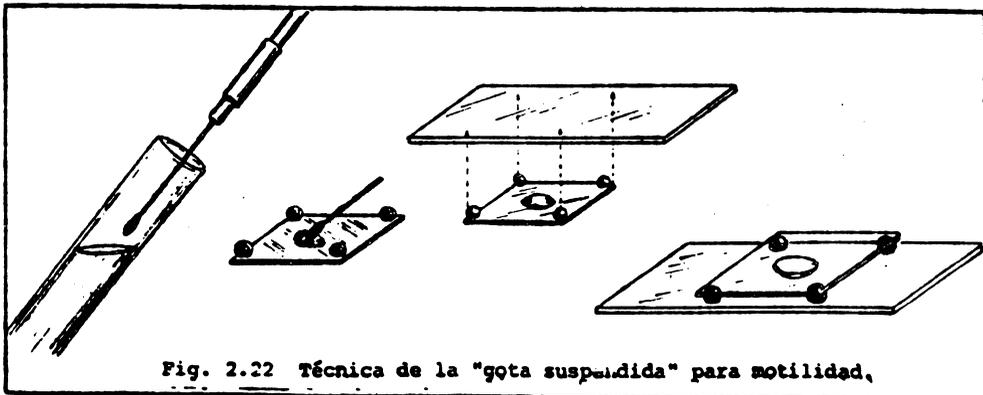




Fig. 2.23 Preparaciones húmedas para motilidad.

ESTUDIO DE MOTILIDAD EN AGAR

En gelosa sólida o semisólida los organismos móviles muestran un patrón típico de crecimiento, el medio de S.I.M. (Semisólido 0.75% de agar), es un medio de reacción múltiple en el cual la motilidad puede ponerse de manifiesto por la observación del crecimiento diseminante (Tittsler y Snadholzer, 1936).

Fig. 2.24 Prueba de motilidad en el medio de SIM: prueba negativa (A); prueba positiva (B).



TECNICA:

Inocular por picadura del centro del medio un cultivo de 18 a 24 horas de incubación, la aguja de inoculación debe de alcanzar una profundidad de 1.2 cm.

Incubar a 35 -37°C por 24 a 48 horas; si resulta negativo, incubar a 21 - 25° C durante 5 días.

RESULTADO

Prueba positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbidez. Pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas (Ver Fig. 2.24).

Prueba negativa: sin motilidad; crecimiento acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio circundante se mantiene claro.

Medio de control (no inoculado); no hay crecimiento en el espesor del agar.

La motilidad en este medio puede observarse mejor cuando se incorpora un colorante de tetrazolium al medio (Kelly y Fulton, 1953); en esta variante los organismos móviles muestran una nubosidad turbia rosada que se difunde al medio. En la prueba negativa; el crecimiento bacteriano produce una línea rojo brillante limitada a seguir la línea de siembra. El medio que le rodea se mantiene claro.

Medio control (no inoculado): no hay crecimiento, el medio se mantiene incoloro y claro⁴¹.

1.3 PRUEBA DE LA OXIDASA

FUNDAMENTO:

determinar la presencia de las enzimas oxidasas.

La prueba de la oxidasa se utilizó originalmente para identificar todas las especies de *Neisseria*, pero más adelante se le utilizó para diferenciar las *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias⁴¹.

REACTIVO

Hidrocloruro de Dimetil o Tetrametil parafenilendiamina en solución acuosa al 1%.

El reactivo es completamente inestable y debe prepararse cada 2 a 3 días, debe conservarse en congelación para evitar su deterioro¹⁹.

PROCEDIMIENTOS:

PRUEBA EN CAJA DE PETRI

En un trozo de papel filtro colocado dentro de una caja de Petri e impreg

nada con el reactivo, se unta la colonia problema utilizando el asa de de platino⁴⁰.

RESULTADO

Prueba positiva: está indicada por la aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel reactivo en un lapso no mayor de 10 segundos.

Prueba negativa: no hay cambio de color sobre el papel o bien éste ocurre después de 10 segundos.

PRUEBA EN TUBO DE ENSAYO

La prueba se realiza dejando caer gotas del reactivo de oxidasa sobre las colonias problema en el medio de cultivo¹⁹.

RESULTADO

Las colonias oxidasa (+), se ponen de un color oscuro rapidamente (Ver Fig. 2.25).

METODO INDIRECTO

Se realiza utilizando discos o tiras impregnadas con oxidasa que se encuentran en el comercio, evita la necesidad de preparar reactivos frescos⁴¹.

Dos métodos:

- Humedecer el disco con agua destilada estéril, colocar en una caja de Petri y agregar después la cantidad recogida con un asa de una colonia problema cultivada en un medio sólido.
- Humedecer la tira reactiva con un cultivo en caldo del organismo sospechoso (Ver Fig. 2.25).

PRECAUCIONES

La prueba de la oxidasa se usa como rutina para la identificación del género Neisseria, no obstante, otros géneros pueden mostrar también una reacción oxidasa positiva:

Alcaligenes faecalis

Vibrio coma

Algunas especies de Brucella

La familia Enterobacteriaceae (son oxidasa negativos).

No debe intentarse realizar una prueba de oxidasa de las colonias cultivadas en un medio que contenga glucosa, ya que su fermentación inhibiría la actividad de la enzima oxidasa, y dará posibles resultados falsamente negativos.

Se recomienda el empleo de asa o aguja de inoculación de platino para retirar las colonias problema del medio sólido, en este sentido Steel afirma que la presencia de un simple vestigio de hierro puede por sí sólo catalizar la oxidación del reactivo fenilendiamina, dando una reacción falsa positiva⁴¹.

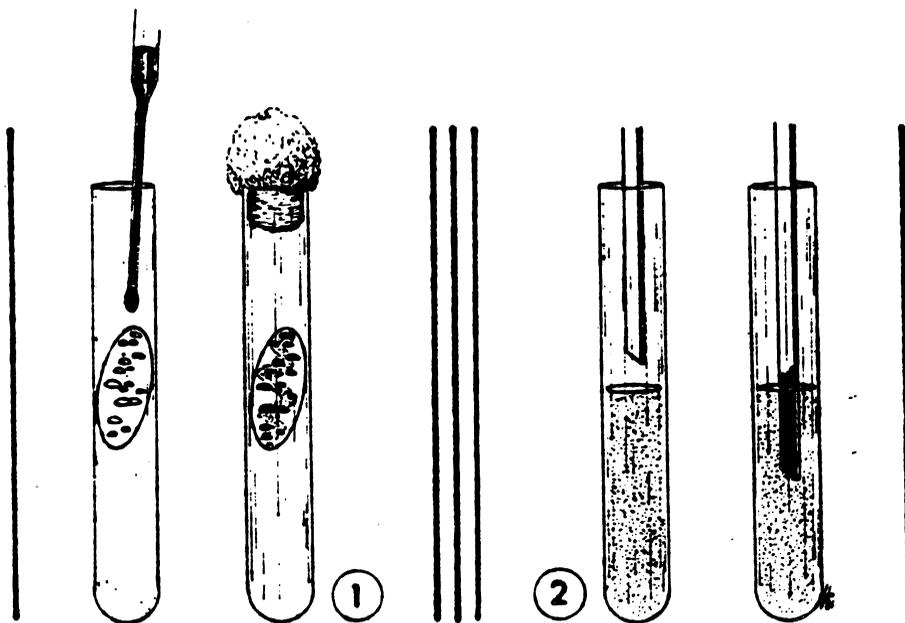


Fig. 2.25 Prueba de la oxidasa. 1) Reacción positiva en la prueba de tubo; 2) prueba positiva, utilizando tiras impregnadas con oxidasa.

1.4 PRUEBA DEL ACIDO DE LA GLUCOSA

FUNDAMENTO:

determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico (glucosa) incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible^{11, 41}.

BASES BIOQUIMICAS

Entre los productos comunes de la degradación de los carbohidratos por los microorganismos, se encuentran ácidos orgánicos (por ejemplo, ácidos láctico y acético) y gases (por ejemplo, anhídrido carbónico e hidrógeno). Los tipos de productos formados y la proporción de éstos, dependen de la especie de microorganismo y del carbohidrato particular utilizando⁴¹.

Las aguas peptonadas con azúcares, son las más utilizadas para estos estudios. En tal medio, suministramos peptonas, las cuales durante el crecimiento de la bacteria, son demolidas en substancias de reacción alcalina; si en el medio existe un carbohidrato, alcohol u otra substancia (azúcar), que puede ser atacada por las bacterias ya sea por oxidación o fermentación, podrá ser producido el ácido, el cual sólo será detectado por un indicador de pH en el medio, cuando el ácido producido del azúcar exceda al álcali de la peptona. La visibilidad de la reacción es influida por: 1) las propiedades amortiguadoras del medio y 2) por el indicador empleado, por ejemplo, el azul de bromotimol muestra la producción de ácido cuando el valor del pH desciende de 6.0 a menos, mientras que el púrpura de bromocresol no cambia de color sino hasta cuando el pH desciende a cerca de 5.0.

Con los azúcares en agua peptonada, normalmente se emplea el indicador de Andrade, el cual, toma un color rosa a un pH de 5.5 más o menos¹⁸.

La introducción de un tubo simple para gas (Durham, 1898) permite, por inspección, detectar la producción de gas¹⁹.

MEDIO DE PRUEBA

Ingredientes:

Peptona 10 mg.

NaCl 5 mg.

Agua destilada 1000 ml.

Disolver por calentamiento, ajustar el pH a 8.0 - 8.4, hervir por 10 minutos, filtrar, ajustar el pH a 7.2 - 7.4 y esterilizar a 115° C por 20 minutos¹⁸.

Además, contiene: indicador de Andrade y una solución de glucosa al 1%.

Antes de poner en el autoclave el medio, colocar un tubo de Durham en posición invertida (Ver Fig. 2.26).

PROCEDIMIENTO

Inocular el medio con el microorganismo en cuestión por agitación del asa, incubar a 37° C por 24 horas.

RESULTADO

Producción de ácido: el medio se torna de color rosado.

Reacción alcalina: medio incoloro o amarillo.

Producción de gas: cualquier signo, aún una pequeña burbuja de gas aislada, es prueba de producción gaseosa. A menudo es tan grande el volumen de gas que reem plaza completamente el medio del tubo de Durham⁴¹ (Ver Fig. 2.26).

1.5 PRUEBA DE OXIDO - FERMENTACION

FUNDAMENTO:

determinar si los microorganismos atacan a un carbohidrato por oxidación o fermentación, la prueba se realiza dejan do crecer la bacteria en dos tubos con el medio de Hugh y Leifson¹⁹.

MEDIO DE PRUEBA O-F'

Se utiliza el medio basal OF, el cual es un medio semisólido en tubo de color verde botella que fué introducido por Hugh y Leifson en 1953, y que permite conocer si el germen en cuestión utiliza el carbohidrato en presencia o ausencia de oxígeno. El medio contiene peptonas y azul de bromotimol como indicador de pH. Generalmente el azúcar incluido en el medio, es la glucosa^{18, 40}.

PROCEDIMIENTO

Dos tubos con el medio basal OF, recientemente preparados, se inoculan por picadura profunda con la bacteria en cuestión. El medio de un tubo se cubre con una capa (4 - 5 mm) de parafina blanda (petrolato), aceite de parafina o vaspar estériles, para obtener un ambiente anaerobio, el otro tubo se deja sin sellar. Las bacterias por lo tanto, pueden clasificarse en tres grupos:

- a) No oxidantes; no fermentadoras: no utilizan el carbohidrato.
- b) Oxidantes; no fermentadoras: requieren el oxígeno para utilizar el carbohidrato.
- c) Fermentadoras: actúan sobre el carbohidrato en ausencia o presencia de oxígeno.



Fig. 2.26 Presencia de gas en el tubo invertido de Durham.

INCUBACION:

incubar los tubos de 35 -37° C, de 24 horas a 7 días.

RESULTADOS

Las bacterias oxidantes muestran producción de ácido solamente en el tubo abierto.

Las bacterias fermentadoras muestran ácido en el tubo "sellado" con parafina e iniciándose desde el fondo en el tubo abierto (Ver cuadro 2.10).

CUADRO 2.10**Determinaciones Oxido-Fermentación**

REACCION	TUBO	TUBO ABIERTO	TUBO "SELLADO"
Oxidación (O)	Abierto	amarillo (A)	verde (-)
Fermentación (F) (aerogénica)	Cubierto	amarillo (A)	amarillo (A)
Fermentación (F) (anaerogénica)	Cubierto	amarillo (AG)	amarillo (AG)
(O / F) negativo	Ninguno	azul o verde	verde (-)
(O / F) positivo	Ambos	amarillo (A o AG)	amarillo (A o AG)

FUENTE: Mac Faddin J. F., 1979.

Además de la utilización de los hidratos de carbono, puede detectarse con un medio OF la producción de gases y la motilidad (Cowan y Steel, 1966).

Registrar la producción de gas y/o ácido y la reacción de motilidad de cada tubo utilizando las siguientes abreviaturas:

- REACCIONES CON HIDRATO DE CARBONO

Acido: (A)

Acido y gas: (AG)

Sin cambio o reacción alcalina: (SC) o (-)

- DETERMINACIONES OF (Ver Fig. 2.27)

Fermentativa: (F)

Oxidativa: (O)

Ni oxidativa ni fermentativa: OF (-)

Oxidativa y fermentativa: OF (+)

- MOTILIDAD

Motilidad (+): Crecimiento que se aleja de la línea de punción

Motilidad (-): Crecimiento limitado a la línea de punción⁴¹.

1.6 PRUEBA DEL CITRATO

FUNDAMENTO:

determinar si un organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad en el medio⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono. Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs.

El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarbóxico o el ciclo de fermentación del citrato depende de la enzima citritasa (citrato - oxalacetato - liasa) o citrato desmolasa (Sokatch, 1969), se considera que el oxalacetato y el acetato resultan de la descomposición inicial.

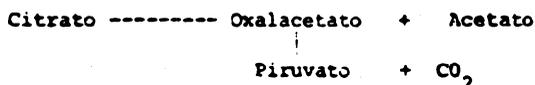
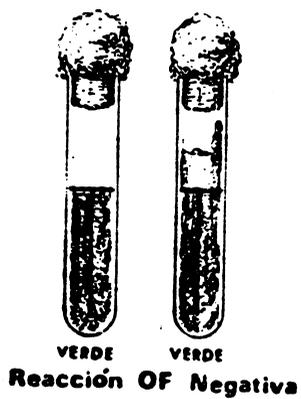
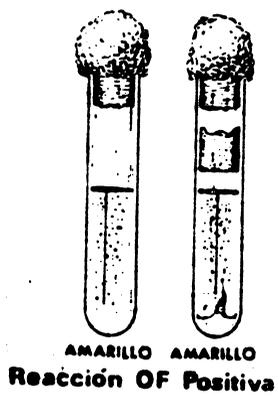
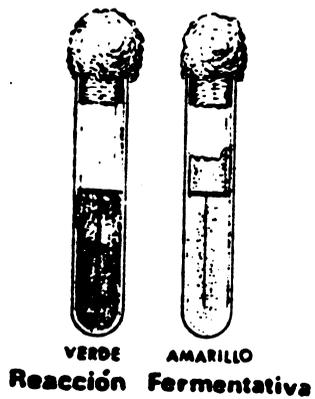
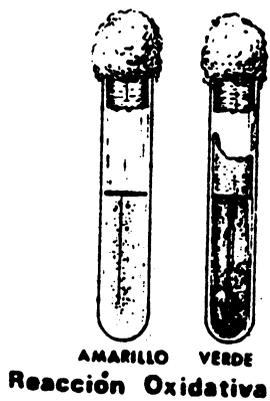
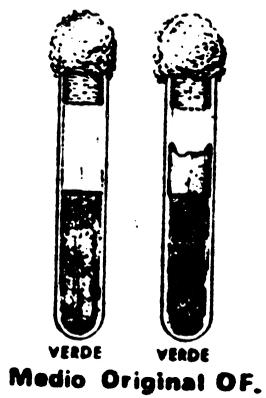
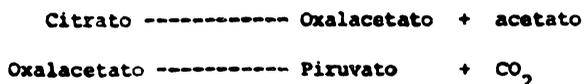


Fig. 2.27 Determinaciones O/F en el medio de Hugh y Leiffson.



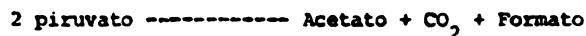
Independientemente de los productos terminales producidos, el primer paso de la fermentación del citrato da por resultado la producción de piruvato, la degradación del piruvato depende, entonces, del pH presente del medio.



pH alcalino:



pH ácido:



El medio empleado para la fermentación del citrato contienen también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono utiliza también las sales de amonio como única fuente de Nitrógeno, las sales de amonio se desdoblan en amoníaco (NH_3) con la consiguiente alcalinidad del medio^{18, 41}.

PROCEDIMIENTOS

MEDIO DE CITRATO DE SIMMONS:

es un medio sólido color verde botella de superficie inclinada. Se siembra por estría continua en la superficie. Contiene citrato de sodio, una sal de amonio y un indicador de pH que es azul de bromotimol.

INCUBACION

Inocular el medio con un cultivo puro de 18 a 24 horas. Incubar a 37° C de 24 horas a 7 días.

RESULTADOS

Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el medio (Ver Fig. 2.28).

Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color en el medio.

PRUEBA DE LA SANGRE CITRATADA

(Método de Cordaro y Sellers, 1968).

Demuestra la facultad de una bacteria de utilizar el citrato que se encuentra en la sangre citratada formando un coágulo.

MEDIO DE PRUEBA

En un medio de caldo BHI, agregar asépticamente 15 ml de sangre citratada, mezclar y empleando técnicas asépticas distribuir en tubos de ensayo y al macerar la mezcla de caldo - sangre en refrigeración (se conserva de 1 - 2 meses)^{11, 41}.

INCUBACION

Inocular abundantemente con un cultivo puro de 18 horas e incubar a 37° C de 1 a 3.5 horas. Examinar los tubos cada hora.

RESULTADOS

Prueba positiva: presencia de un coágulo firme.

Prueba negativa: no hay formación de coágulo; el medio se mantiene homogéneo (Ver Fig. 2.28).

1.7 PRUEBA DEL MALONATO

FUNDAMENTO:

determinar la capacidad de un organismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad del medio⁴¹.

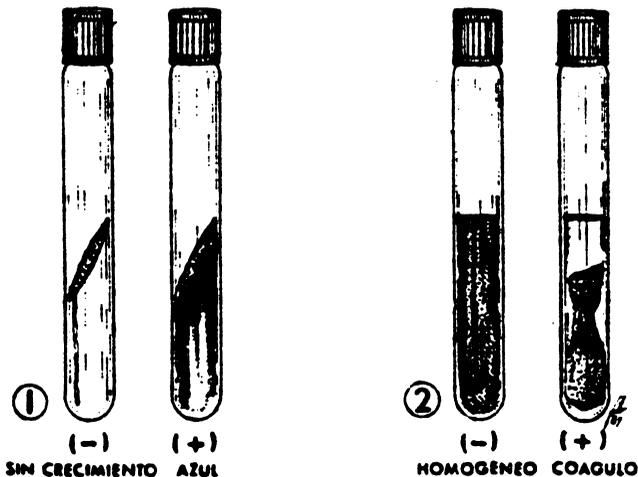


Fig. 2.28 Prueba del citrato: 1) Agar de Simmons; 2) Prueba de la sangre citratada.

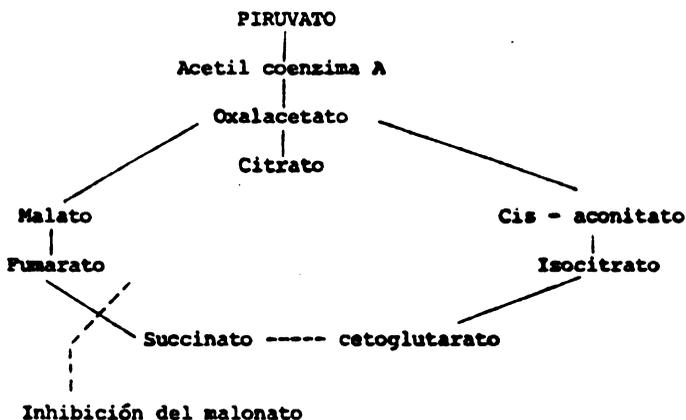
BASES BIOQUIMICAS

El malonato es un inhibidor enzimático que interfiere en la oxidación del ácido succínico en ácido fumárico, inhibiendo la acción catalítica de la enzima succinato - deshidrogenasa.

El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso llamado inhibición competitiva. La reacción enzimática normal (conversión del ácido succínico en fumárico), puede ser inhibida por un compuesto orgánico que estructuralmente es similar al sustrato normal, el ácido succínico. El ácido malónico es estructuralmente análogo al ácido succínico y compite por su lugar en la enzima.

COOH	COOH
CH ₂	(CH ₂) ₂
3 COOH	4 COOH
Acido malónico (Malonato)	Acido succínico

El ácido malónico se une a la enzima, esto ocasiona un bloqueo de la oxidación del ácido succínico, y si está bloqueada la activación no puede formarse un nuevo producto (ácido fumárico).



La acumulación de ácido succínico debida a la inhibición de la succinato-deshidrogenasa interrumpe el ciclo de Krebs, privando a algunos microorganismos de su fuente de energía, e interfiere también en el ciclo del ácido glicoxílico, impidiendo la producción de nuevos intermediarios para

la biosíntesis de nuevos compuestos necesarios para el metabolismo.

El resultado final, es que un organismo es incapaz de crecer y reproducir se a menos que pueda fermentar o utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono⁴¹.

PROCEDIMIENTOS

Prueba en el caldo de malonato (pH: 6.7); es un medio líquido color verde, que se inocula agitando el asa dentro del medio, contiene malonato de sodio, dextrosa y un indicador de pH que es el azul de bromotimol.

TECNICA:

Inocular con un cultivo puro de 18 a 24 horas.

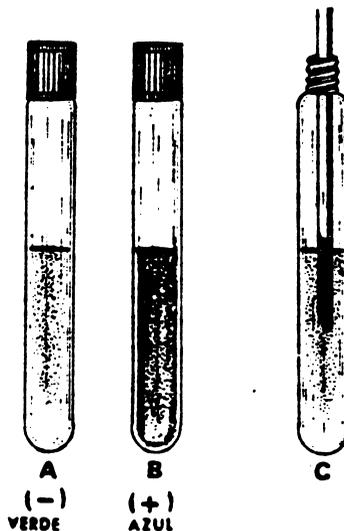
Incubar a 35° C de 24 a 48 horas y examinar.

RESULTADOS

Prueba positiva: color azul claro a azul de prusia intenso en todo el medio (Ver Fig. 2.29).

Prueba negativa: no se observa cambio de color (verde) o amarillo (únicamente fermentación de glucosa)¹¹.

Fig. 2.29 Prueba del malonato: caldo de malonato; A) reacción negativa; B) reacción positiva y C) utilización de tiras reactivas.



PRUEBA RAPIDA (tiras reactivas)

Existen en el comercio tiras impregnadas con el reactivo (malonato), que son utilizadas para la identificación rápida de las enterobacterias, los resultados se obtienen en las primeras 4 horas.

La correlación con las pruebas estándar es de 98 - 99.5% utilizando este método (Ver Fig. 2.29).

1.8 REACCION DE LA UREASA

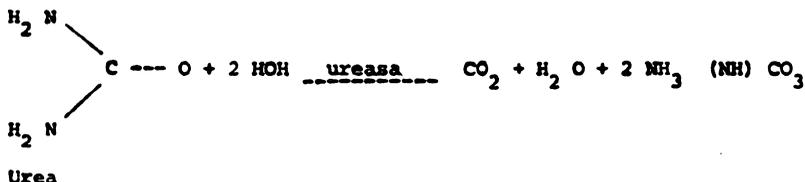
FUNDAMENTO:

determinar la capacidad de un organismo para desdoblar la Urea, formando dos moléculas de amoniaco por acción de la enzima ureasa.

Esta prueba se utiliza, sobre todo, para diferenciar los organismos del género Proteus rápidamente ureasa positivos de otros miembros de las Enterobacterias⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

La hidrólisis de la Urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amonio, la actividad de la ureasa se demuestra por la producción de álcali a partir de una solución de Urea¹⁸.



La ureasa es considerada un enzima constitutiva dado que es sintetizada por ciertos microorganismos sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato, la Urea, el pH óptimo para la actividad de la ureasa es de 7.0.

MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRUEBA

CALDO DE UREA. PH: 6.8 (Rustingian y Stuart, 1945)

Es un medio líquido color amarillo - anaranjado que se inocula por agitación del asa dentro del medio, sus ingredientes principales son: Urea, fosfato de sodio, extracto de levadura, y rojo de Fenol como indicador de pH^{18, 41}.

AGAR UREA. PH: 6.8 (Christensen, 1946)

El medio de Christensen evita la necesidad de que un organismo utilice el amoniaco como su única fuente de nitrógeno, así como permite la detección de la hidrólisis de la urea causada por otros miembros de enterobacterias, cuya actividad ureasa es muy leve y retardada^{18, 41}.

Es un medio sólido con superficie inclinada de color amarillo pálido, que se siembra por estría continua en la superficie del agar. No se hace pun

ción de la capa profunda, porque ella sirve para control del color, contiene peptonas, fosfato monopotásico, glucosa, Urea y rojo de Fenol como indicador de pH.

PROCEDIMIENTOS

CALDO UREA:

inocular un cultivo puro de 18 - 24 horas densamente y agitar suavemente para lograr la suspensión bacteriana. Incubar a 37° C y observar las reacciones después de 24 - 48 horas.

AGAR UREA DE CHRISTENSEN:

inocular un cultivo de 18 - 24 horas en la superficie del agar, incubar a 35 - 37° C y observar reacciones de 6 a 24 horas y todos los días siguientes durante 6 días.

RESULTADOS

CALDO UREA DE STUART

Reacción positiva: color rojo rosado intenso en todo el caldo.

Reacción negativa: no se produce cambio de color (Ver Fig. 2.30- A).

AGAR UREA DE CHRISTENSEN

Reacción positiva: color rojo rosado intenso en la superficie del agar. El color puede penetrar en el medio.

Reacción positiva rápida: de 1 - 6 horas (en el género Proteus).

Reacción negativa: no se produce cambio de color (Ver Fig. 2.30- B).

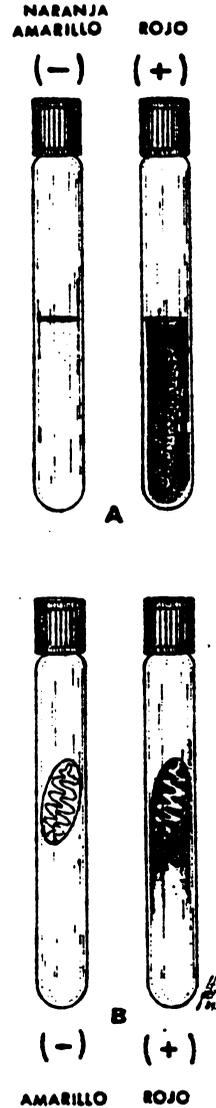


Fig. 2.30 Reacciones en la prueba de urea.

1.9 PRUEBA DE REDUCCION DEL NITRATO

FUNDAMENTO:

determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas que reduzcan el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato.

En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas, los productos finales de la reducción del nitrato son: nitrito, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso e hidroxidolamina⁴¹.

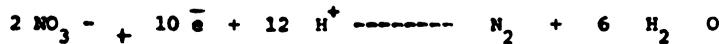
REDUCCION DEL NITRATO AL NITRITO



El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana, el más común es el nitrógeno molecular (un gas) por medio de la reducción del nitrito; estos productos, según las condiciones del medio ya no son más oxidados o asimilados en el metabolismo celular, sino que se excretan en el medio.

La reducción del nitrato a gas nitrógeno u óxido nitroso ($\text{N}_2 \text{O}$) se denomina desnitrificación.

NITRATO EN NITROGENO MOLECULAR



El proceso de desnitrificación, el óxido nitroso (un intermediario) puede acumularse si la concentración de nitrato es alta; sin embargo, cuando ésta baja el óxido nitroso es reducido nuevamente a nitrógeno molecular.

La reducción, por lo tanto, en la prueba de reducción del nitrato, se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio⁴¹.

MEDIO DE PRUEBA

CALDO NITRATO (pH: 7.0):

es un medio líquido, de color amarillo, su ingrediente principal es el nitrato de potasio. El medio puede llevar incluido un tubo invertido de Durham, utilizado para demostrar la formación de gas a partir del nitrato¹⁸.

REACTIVOS:

SOLUCION A:

Acido sulfánilico	8.0 g.
Acido acético 5 N	1000 ml.

SOLUCION B:

Alfa - naftilamina	5.0 g
Acido acético 5 N	1000 ml.

PROCEDIMIENTOS

Inocular el medio con un cultivo puro de 18 a 24 horas, incubar a 35 - 37° C de 12 horas hasta 5 días.

La incubación durante 5 días no es necesaria para las Enterobacterias, ya que éstas, reducen el nitrato a nitrito en 8 horas.

FASE 1

- Agregar directamente al cultivo incubado 1 ml de la solución de ácido sulfánilico y luego 1 ml de la solución de alfa-naftilamina gota a gota¹⁸.

RESULTADOS:

Positivo: color rojo del medio dentro de los 30 segundos inmediatos, que indica una prueba completa; desechar el tubo.

Negativo: no aparece color. Continuar con la fase 2 (Ver Fig. 2.31).

FASE 2

- Agregar directamente al tubo que contiene los reactivos A y B, una pequeña cantidad de polvo de zinc (20 mg.).

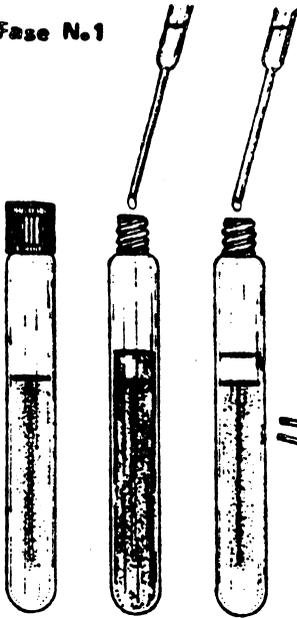
- El polvo de zinc debe estar libre de nitratos o nitritos.

RESULTADOS

Si se produce un color rojo, el zinc a reducido el nitrato a nitrito, esto indica que el nitrato estaba presente y no se reducía por la acción bacteriana.

Si no se produce el color rojo, indica que las bacterias han reducido los nitratos y los nitritos hasta gas nitrógeno (Ver Fig. 2.31).

Fase N.º 1



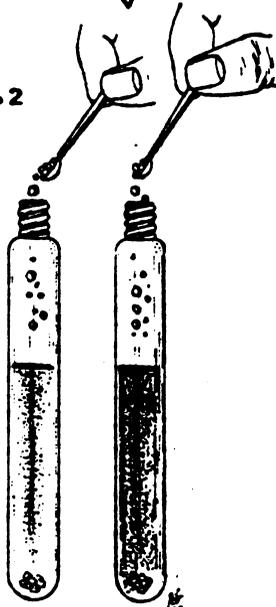
(+)
ROJO

(-)
AMARILLO



Reactivos

Fase N.º 2



(+)
AMARILLO

(-)
ROJO

Fig. 2.31 Lecturas en la reducción del nitrato.

1.10 PRUEBA DE ROJO DE METILO- VOGES PROSKAUER (MR- VP)

FUNDAMENTO:

Rojo de metilo: comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa.

Voges Proskauer: (VP): determinar la capacidad de algunos organismos de producir un compuesto final neutro, el acetil metil carbinol (acetofina), a partir de la fermentación de la glucosa⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

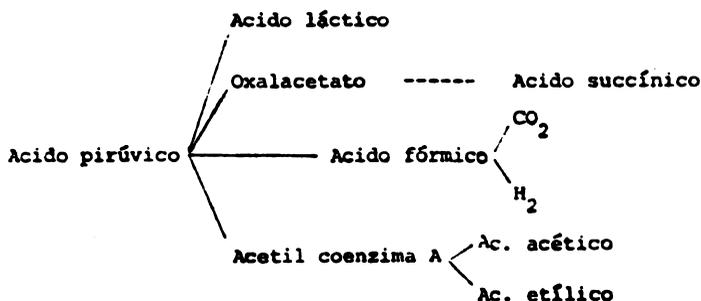
La prueba de rojo de metilo (MR) se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno presente cuando un organismo fermenta la glucosa.

Todos los miembros de las Enterobacterias son, por definición, fermentadores de la glucosa. En el caldo MR - VP, después de 18 a 24 horas de incubación, la fermentación resultante da productos secundarios metabólicos ácidos; por lo tanto, inicialmente todos los entéricos darán una reacción positiva con el rojo de metilo; sin embargo, después de más tiempo de incubación como lo exige la realización de la prueba (de 2 a 5 días), aquellos organismos que son rojo de metilo positivos continúan produciendo más ácidos, y dan como resultado un bajo pH terminal, venciendo el sistema amortiguador de fosfato, y manteniendo un medio ácido (pH: 4.2).

Los organismos rojo de metilo negativos continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol (acetofina) neutro, lo que da un elevado pH terminal que disminuye la acidez del medio, elevando el pH la neutralidad (pH: 6.0)⁴¹.

La reacción de Voges Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetofina), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa, ésta es metabolizada en ácido piruvico, una bacteria puede seguir muchas vías, la producción de acetofina es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.

Las Enterobacterias se clasifican como fermentadoras de ácidos mixtos o del ácido fórmico, lo cual indica que sus productos terminales por la utilización de la glucosa son ácidos.



Estos fermentadores de ácidos mixtos pueden ser divididos a su vez en dos grupos: 1) los que producen ácidos, pero no 2, 3 Butilenglicol como la E. coli (VP -), o 2) los que producen 2, 3 Butilenglicol como principales productos terminales, como los grupos Klebsiella - Enterobacter (VP+).

El producto terminal en la utilización del piruvato por los grupos Klebsiella - Enterobacter, Serratia, Bacillus, es el 2, 3 Butilenglicol. La reacción de (VP) se basa en la detección de la acetofina, un precursor de la producción de 2, 3 Butilenglicol⁴¹.

MEDIO DE PRUEBA

CALDO MR - VP:

son dos tubos que contienen el medio de MR - VP, modificado del medio original de Clark y Lubs (1915). Se inocula por agitación del asa en el medio, contiene peptona amortiguada, dextrosa al 0.5% y fosfato de potasio (Buffer).

REACTIVOS:

SOLUCION DE ROJO DE METILO (MR)

Rojo de metilo	0.04 g.
Etanol	40 ml.
Agua destilada	a 100 ml.

Disolver el rojo de metilo en etanol y diluir al volumen con agua; puede utilizarse alcohol etílico de 95°.

REACTIVO VP (de Barritt)

α -naftol (1 - naftol)	5 g.
Alcohol etílico (absoluto)	100 ml.

Disolver el α - naftol en menos de 100 ml. de alcohol etílico absoluto. Trasvasar la solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agregar alcohol etílico absoluto, c.s.p. 100 ml.

Hidróxido de potasio	40 g.
Agua destilada	100 ml.

Pesar rápidamente el hidróxido de potasio y disolverlo en menos de 100 ml de agua destilada. Colocar en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura. Enfriar y trasvasar a un frasco de 100 ml y agregar agua destilada, c.s.p. 100 ml.¹⁹.

PROCEDIMIENTOS

PRUEBA DE ROJO DE METILO (MR)

Inocular el medio con un cultivo puro de 18 a 24 horas e incubar a 37° C por 48 horas.

Agregar 5 gotas del indicador de pH rojo de metilo directamente al medio antes de intentar la interpretación.

RESULTADO

Prueba MR positiva: el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH: 4.4) en la superficie del medio.

Prueba MR negativa: color amarillo (pH: 6.0) en la superficie del medio (Ver Fig. 2.32).

Reacción retardada: color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba.

REACCION DE VOGES PROSKAUER (VP)

Realizar la lectura después de 24 - 48 horas; puede necesitar una incubación más prolongada, hasta 10 días.

Agregar directamente los reactivos (VP), en el orden siguiente:

- Primero: 0.6 ml de una solución de α -naftol al 5%.
- Segundo: 0.2 ml de la solución de KOH al 40%.

Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener la reacción

RESULTADOS

Reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (nos indica la presencia de acetoina), (Ver Fig. 2.32.).

Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio (mismo color del reactivo).

PRECAUCIONES

Las pruebas de MR - VP, no ofrecen confianza como único medio necesario para diferenciar la E. coli de los grupos Klebsiella - Enterobacter. Deben realizarse pruebas de citrato y de indol junto con las reacciones de MR - VP de rutina (pruebas del INVIC).

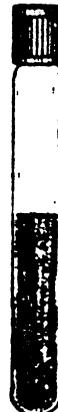
M.R.



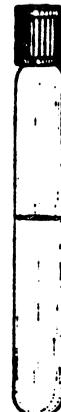
Amorillo



24 Hrs.



(+) Rojo

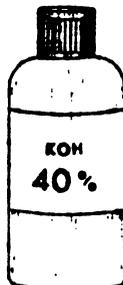
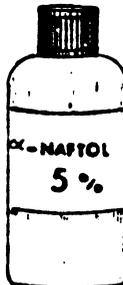
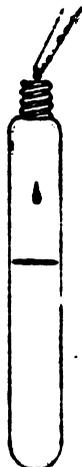


(-) Amorillo

V.P.



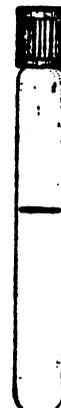
Amorillo



48 Hrs.



(+) Rojo



(-) Amorillo

Fig. 2.32 Resultados en el medio de MR-VP.

Muchas personas tienen la errónea impresión de que un organismo que es VP positivo es automáticamente MR negativo, o viceversa, basados en el fundamento de la prueba, pero algunos organismos como el Enterobacter hafniae (cuando es incubado a 37° C) y Proteus mirabilis pueden dar tanto una reacción MR positiva como VP positiva⁴¹.

El orden de adición de los reactivos de Barritt es muy importante. Agregar primero el α -naftol, seguido por el KOH. La inversión del orden de incorporación del reactivo puede dar un resultado débilmente positivo o falsamente negativo.

2. PRUEBAS DE REACCION MULTIPLE

2.1 PRUEBAS EN EL MEDIO S.I.M.

FUNDAMENTO:

el medio de S.I.M., se utiliza para realizar tres pruebas a la vez, que deben ser leídas y reportadas por separado, es usado rutinariamente en la diferenciación de cultivos puros de Enterobacterias y que detecta la producción de Sulfuros, Indol y Motilidad⁸.

Ayuda a la diferenciación de las siguientes especies:

CUADRO 2.11

Reacciones de algunas Enterobacterias en el medio de S.I.M.

ESPECIE	Producción de H ₂ S	Producción Indol	Motilidad
Salmonella typhi	+ o -	-	+
Salmonella	+ o -	-	+
Shigela	-	+ o -	-
E. coli	-	+	+ o -
Klebsiella	-	+ o -	-
Enterobacter	-	-	+
Citrobacter	+	-	+

FUENTE: Mac Faddin, 1979.

BASES BIOQUIMICAS

PRODUCCION DE ACIDO SULFHDRIICO:

determina si se ha liberado ácido sulfhídrico ($H_2 S$) por acción enzimática, de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro.

La peptona, la cisteína, la cistina y el tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir ($H_2 S$). La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa.

Se encuentran en el comercio muchos medios que contienen peptona e hierro y que sirven para detectar la producción de ácido sulfhídrico entre las enterobacterias. Los indicadores de $H_2 S$ varían entre estos medios: hierro, sulfato ferroso, sulfato de amonio ferroso o férrico, tiosulfato de sodio o sulfito de bismuto; sin embargo, el principio es el mismo⁴¹.

REACCION TOTAL:

Bacteria (medio ácido) + Tiosulfato de sodio ----- Gas $H_2 S$ ↑

$H_2 S$ + iones férricos ----- Sulfuro ferroso ↓
Precipitado negro insoluble

PRUEBA DEL INDOL:

determina la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula de Triptefano.

El Triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol escatol (metilindol) e indolacético.

El principal intermediario de la degradación del Triptófano es el ácido indolpirúvico, del cual puede formarse indol por desaminación, y escatol por descarboxilación del ácido indolacético.

El indol es volátil y puede ser detectado tratando el medio con P - dimetilaminobenzalohéido o con tiras de papel impregnadas con ácido oxálico mantenidas cerca de la boca del tubo de cultivo por el tapón de algodón. Ambos métodos son sensibles y dan los mismos resultados.

El reactivo de Kovác's o Ehrlich, tienen la ventaja de que el solvente (alcohol amílico o etanol) se encuentran en la solución a prueba^{18, 41}.

PRUEBA DE MOTILIDAD

La motilidad del germen se demuestra por una turbidez difusa en el seno del medio.

MEDIO DE PRUEBA

El medio de S.I.M. es un medio semisólido (0.75% de agar) en tubo, que se siembra por picadura. Contiene peptona de caseína, sulfato de hierro y amonio, tiosulfato de sodio y agar.

REACTIVOS (para demostrar Indol)

REACTIVO DE KOVAC (1928).

P - dimetilaminobenzaldehído	5 g.
Alcohol amílico	75 ml.
HCl conc.	25 ml.

Disolver el aldehído en el alcohol por calentamiento ligero en baño María (50 - 55° C). Enfriar y agregar el ácido, proteger de la luz y almacenar a 4° C.

REACTIVO DE EHRLICH

P - dimetilaminobenzaldehído	1 g.
Etanol absoluto	95 ml.
HCl conc.	20 ml.

Disolver el aldehído en el etanol y agregar el ácido, proteger de la luz¹⁸.

PROCEDIMIENTO

Inocular la cepa pura en estudio por picadura, alcanzando ésta unos 3/4 de la longitud de la columna, retirar la aguja siguiendo la línea de inoculación e incubar de 24 a 48 horas a 37° C⁸.

RESULTADO

Motilidad:

prueba positiva: difusión del germen en el medio, provocando turbidez (Ver Fig. 2.33)

prueba negativa: crecimiento acentuado en la línea de inoculación.

La temperatura de incubación es importante: en la mayor parte de los microorganismos móviles, lo son a temperaturas más bajas (15 a 25° C) y pueden no ser móviles a 37° C¹⁸.

Acido sulfhídrico:

prueba positiva: se observa ennegrecimiento del medio siguiendo la línea de inoculación e en todo el agar (Ver Fig. 2.33)

prueba negativa: no se observa ennegrecimiento en el medio.

UTILIZACION DE TIRAS DE ACETATO DE PLOMO

Detección de H₂ S de rutina:

Prueba positiva: coloración negro - pardusca de la tira de papel.

Prueba negativa: no hay altercaciones ni coloración de la tira.

Detección del Indol

agregar directamente al tubo incubado, 0.5 ml del reactivo de Kovác o Ehrlich, agitar perfectamente y examinar 1 minuto después.

Prueba positiva: presencia de un anillo rojo en la superficie del medio (Ver Fig. 2.33).

Prueba negativa: no se produce cambio de color; toma el color del reactivo.

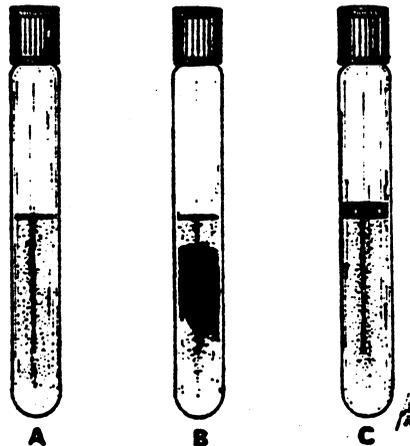


Fig. 2.33 Interpretaciones en el medio de SIM:
A) motilidad positiva; B) producción de H₂ S; C) producción de Indol.

TIRA IMPREGNADA CON ACIDO OXALICO (Prueba rápida)

- Colocar una cinta con ácido oxálico entre el tapón y el tubo.

Prueba positiva: formación de un color rosa pálido.

Prueba negativa: no se aprecia cambio de color.

2.2 PRUEBA DE LA LECHE CON TORNASOL

FUNDAMENTO:

diferenciar organismos sobre la base de sus múltiples reacciones metabólicas en un medio lácteo.

BASES BIOQUIMICAS

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo: fermentación de la lactosa, caseólisis y coagulación de la caseína.

El tornasol incorporado a la leche es un indicador del pH y un indicador Redox (oxidación-reducción) que hace que el medio pueda indicar diversas funciones. La leche sola contiene el hidrato de carbono lactosa junto con tres importantes proteínas: caseína, lactalbúmina y lactoglobulina. Por lo tanto, un organismo puede mostrar una o varias propiedades metabólicas, cada una propia de una especie determinada, ayudando así a la identificación bacteriana.

FERMENTACION DE LA LACTOSA

El tornasol como indicador de pH es rojo en solución ácida (pH: 4.5) y azul en condiciones alcalinas (H: 8.3). La leche tornasolada presenta un color azul púrpúreo (pH: 6.8) cuando no está inoculada, pero si un organismo es capaz de fermentar la lactosa, produciendo principalmente ácido láctico, se produce una condición ácida indicada por el cambio de color del medio, que se vuelve rojo rosado. Ciertas bacterias que forman álcalis no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco, y dando en consecuencia un pH alcalino que se manifiesta por un color púrpura azulado.

Lactosa ----- glucosa + galactosa

Glucosa ----- ac. pirúvico $\left\{ \begin{array}{l} \text{ácido láctico} \\ \text{ácido butírico} \\ \text{CO}_2 + \text{H}_2 \end{array} \right.$

REDUCCION DEL TORNASOL

El tornasol es un indicador del pH y un indicador de oxidación - reducción. Algunos organismos son capaces de reducir el tornasol a una leucobase (blanca).

FORMACION DE COAGULO Y DIGESTION

Las enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche de lo que resulta su coagulación: la enzima responsable de la formación de coágulo es la renina. La formación de coágulo en la leche tornasolada es causada por: una precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.

FORMACION DE UN COAGULO ACIDO

La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa en condiciones ácidas, produce un coágulo firme, gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo y es fácilmente disuelto cuando es sometido a condiciones alcalinas. La lactosa es fermentada dando ácido láctico y otros ácidos orgánicos como productos finales de la glucólisis, éstos a su vez, se combinan con el caseinato de calcio, sal soluble en agua, para dar caseinógeno que precipita en forma de coágulo insoluble.

Lactosa ----- ácido láctico

Acido láctico +	caseinato de Ca	-----	Caseinógeno
(medio ácido)	(Sal soluble)	caseasa	(insoluble)

DIGESTION (PEPTONIZACION)

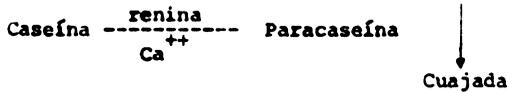
La hidrólisis de la caseína por la actividad enzimática produce una conversión final del precipitado caseinógeno en un líquido claro; el proceso se denomina peptonización, y se manifiesta por una aclaración acuosa del medio causada por la digestión del precipitado (coágulo) y las proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas. Sólo se produce peptonización cuando la bacteria en prueba contiene la enzima proteolítica caseasa.

FORMACION DE UN CUAJO (COAGULO)

La otra forma de coágulo es el cuajo, es el proceso que ocurre por la conversión de la caseína en paracaseína por las enzimas renina, pepsina o quimotripsina contenidas en la leche.

La renina provoca el cuajado de la leche convirtiendo la sal de caseína

soluble (caseinato de calcio) en una paracaseína insoluble (paracaseinato de calcio) que es el cuajo o requeson.



La paracaseína es precipitada como paracaseinato de calcio por arriba de un pH de 4.5; este cuajo es blando, insoluble, no se disuelve en condiciones de alcalinidad y se separa de las paredes del tubo después de algunas horas, dando un líquido residual claro que se denomina "suero".

FORMACION DE GASES

Los gases (CO_2 y H_2) se forman como resultado de la fermentación de la lactosa. Se produce una fermentación turbulenta cuando hay abundancia de gases que descomponen un coágulo ácido.

MEDIO DE LECHE TORNASOLADA (PH: 6.8)

Es un medio diferencial líquido de color azul purpúreo, se siembra por agitación del asa y contiene lactosa, galactosa, trazas de glucosa, caseína, sales minerales y tornasol como indicador de pH¹⁸.

PROCEDIMIENTOS

Inocular un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación.

En caso de Clostridium agregar hierro estéril, por ejemplo, polvo de hierro, limaduras de metal o clavos al tubo.

Incubar a 35 - 37° C por 18 a 24 horas; pueden ser necesarios períodos más largos, hasta 14 días.

RESULTADOS:

ROJO ROSADO (A)

Reacción ácida

Fermentación de la lactosa

AZUL PURPUREO (SC)

No hay fermentación de la lactosa

No hay cambio en el indicador de pH

- AZUL (ALK)

Reacción alcalina

No hay fermentación de la lactosa

Metabolismo de sustancias nitrogenadas

- BLANCO (RED)

Reducción del tornasol a una Leucobase

- DIGESTION (PEPTONIZACION) (D)

- FORMACION DE COAGULO O CUAJO (C)

Coagulación de la proteína de la leche

- GAS (CO_2 y H_2) (G)

Burbujas en el medio

El coágulo puede desintegrarse

- FERMENTACION TURBULENTA (T)

El coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas.

NOTA: En una sola bacteria puede producirse una de estas reacciones metabólicas o una variedad de combinaciones de las mismas⁴¹.

CUADRO 2.12

Posibles lecturas en el medio de leche con tornasol

REACCION	ABREVIATURA
Acido solamente	(A)
Acido con gas	(AG)
Acido con coágulo	(AC)
Acido, coágulo y gas	(ACG)
Acido digestión	(AD)
Coágulo digestión	(CD)
Digestión	(D)
Coágulo, gas	(CG)
Coágulo	(C)
Reducción del tornasol	(Red)
Sin cambio	(SC)

FUENTE: Mac Faddin, 1979.

2.3 PRUEBA DE LA DESCARBOXILACION DE LA LISINA

FUNDAMENTO:

medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido formando una amina, con la consiguiente alcalinidad⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

La prueba se basa en la descaboxilación de la lisina, formación de sulfuros y fermentación de la glucosa; además detectar la desaminación de la lisina.

La descarboxilación es un proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.

El aminoácido L - lisina sufre la descarboxilación para dar una diamina (cadaverina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica lisina - descarboxilasa.

Las descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas; son formadas por un organismo solamente cultivadas en un medio ácido en presencia de un sustrato específico. Los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. El proceso enzimático resultante es irreversible, no oxidativo, y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal.

En el laboratorio de bacteriología clínica, las tres descarboxilasas utilizadas para la indentificación bacteriana son la lisina, ornitina y la arginina.

La descarboxilación de la lisina, puede ser detectada en forma simple por la observación del cambio de color de un indicador de pH, incorporado al medio de cultivo⁴¹.

MEDIO DE L.I.A. (Lisina - hierro - agar)

Es un medio diferencial empleado para caracterizar las Enterobacterias. Es muy útil para diferenciar tempranamente cepas de Salmonella y Arizona de Citrobacter. Es un medio sólido en tubo con superficie inclinada de color púrpura, contiene lisina (1%), glucosa, un indicador de H₂S y púrpura de bromocresol como indicador de pH⁶.

PROCEDIMIENTOS

Inocular el medio por estría en la superficie del agar. Utilizar un cultivo puro de 18 a 24 horas.

Incubar a 37° C por 48 horas; puede ser necesaria la incubación prolongada, hasta 4 días.

RESULTADOS

Prueba positiva: Púrpura ---- Amarillo ---- Púrpura

Prueba negativa: Púrpura ---- Amarillo (solamente fermentación de glucosa), (Ver Fig. 2.34).

NOTA: Todas las Enterobacterias provocan una fermentación inicial de glucosa que produce ácido, que se manifiesta por un cambio de color en el indicador de pH, de púrpura a amarillo en las primeras 10 a 12 horas de incubación. En respuesta a la acidez, los organismos que producen lisina - descarboxilasa forman una amina (cadaverina) que hace que el medio se torne alcalino, pudiendo ser demostrado por el indicador, el cual toma una apariencia púrpura⁴¹.

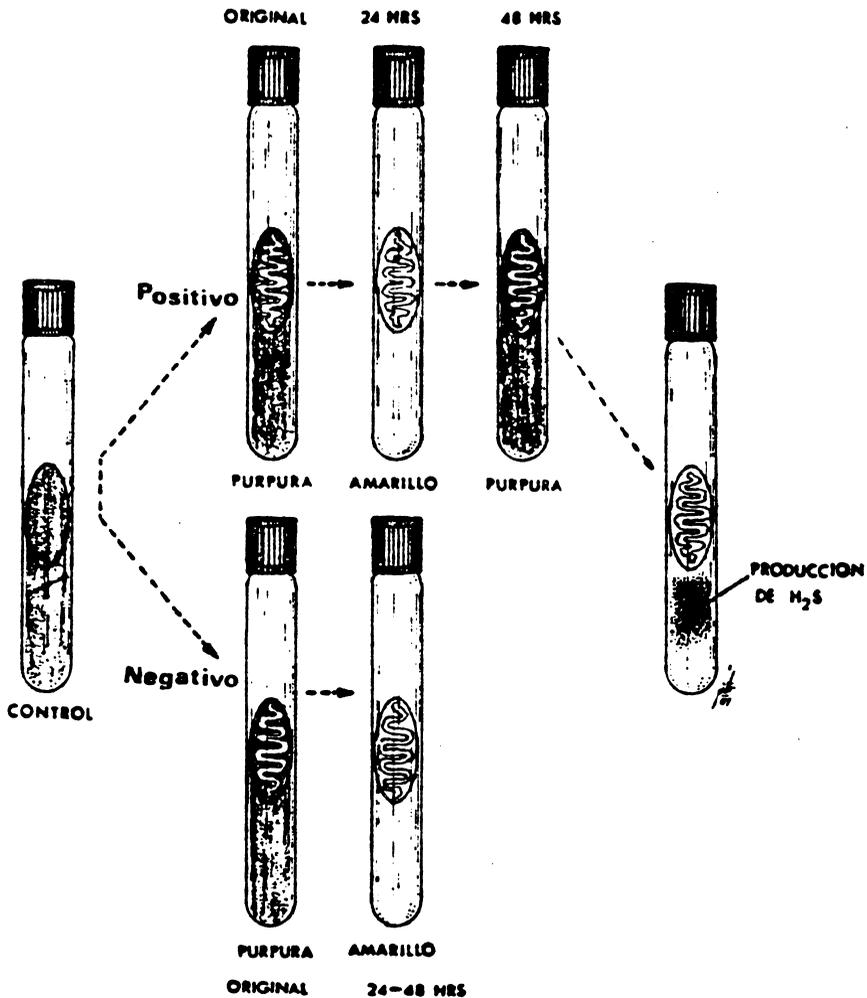
CUADRO 2.13
Reacciones de los grupos entéricos
en medio L.I.A.

Superficie del agar	Pondo del agar	H ₂ S	GAS	GRUPO
Alc.	Alc. o N	-	- o +	Escherichia
Alc.	Acido	-	-	Shigella
Alc.	Alc. o N	+ (-)	-	Salmonella
Alc.	Alc.	+ o -	-	S. typhi
Alc.	Acido	- o +	+ o -	S. paratyphi A
Alc.	Alc. o N	+ (-)	-	Arizona
Alc.	Acido	+ o -	- o +	Citrobacter
Alc.	Alc.	+	- o +	Edwardsiella
Alc. o N	Alc. o N	-	+ o -	Klebsiella, Enterobacter
Alc. o N	Acido	-	- o +	E. cloacae
Alc. o N	Alc. o N	-	-	Serratia
Rojo (Alc.)	Acido	- (+)	-	Proteus, Providencia

FUENTE: Davidson y Bernard, 1983.

Los símbolos incluidos en paréntesis indican reacciones ocasionales.

Alc. = Alcalina, N= Neutro, Rojo= Desaminación oxidativa de la lisina.



Fgi. 2.34 Resultados en el medio de L.I.A. En la prueba positiva, es probable, para algunas Enterobacterias, que el medio muestre un precipitado negro que nos indicaría la producción de H₂ S formado por el metabolismo bacteriano.

2.4 PRUEBAS EN EL MEDIO T.S.I. (Triple azúcar hierro)

FUNDAMENTO:

determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con la producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico⁴¹.

BASES BIOQUIMICAS

La producción de ácido sulfhídrico y/o las formas de fermentación de los hidratos de carbono son generalmente características de los grupos, géneros o especies bacterianos específicos, sobre todo entre las Enterobacterias.

El agar triple azúcar hierro (TSI), es un medio diferencial que se utiliza con un doble propósito: 1) determinar la fermentación de carbohidratos, y 2) determinar la producción de H₂S.

El medio TSI contiene tres hidratos de carbono: lactosa, sacarosa y glucosa. En este agar, algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar todos los hidratos de carbono; otros fermentan solamente la glucosa; y otros, aún no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa. La fermentación del azúcar puede llevarse a cabo con producción o no de gases (CO₂ + H₂).

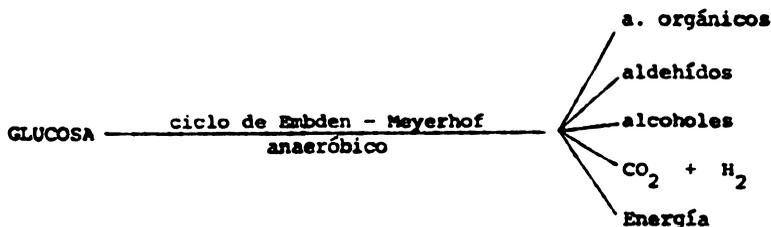
La fermentación se produce aeróbicamente (en la superficie del agar) y anaeróbicamente (en la capa inferior del medio).

FERMENTACION DE LA GLUCOSA SOLAMENTE (Alcalina/ácida).

La fermentación de la glucosa sólo queda indicada por la formación de ácido (amarillo) en el fondo del medio, sin gas o con él, mientras que la superficie permanece alcalina (roja).

La superficie es alcalina (roja), lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa. Después de 18 a 24 horas de incubación la baja concentración de glucosa (0.1%) ha sido consumida por completo y el organismo comienza a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio.

Sin embargo, en la capa profunda del medio se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa, aquí, la glucosa también es degradada después de 18 a 24 horas de incubación; sin embargo, se forman productos finales ácidos dando un pH ácido⁴¹ (color amarillo).

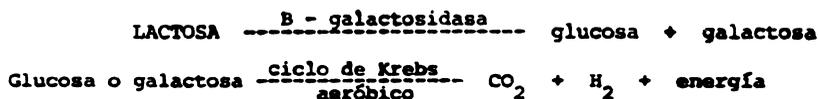


FERMENTACION DE LA LACTOSA Y LA GLUCOSA (Acida / ácida)

La fermentación de la lactosa se demuestra por el desarrollo de ácido y gas tanto en la superficie como dentro de la capa del agar (amarillo / amarillo).

Algunos organismos tienen la facultad de fermentar tanto la glucosa, como la lactosa o la sacarosa en busca de elementos nutritivos, dando una reacción en el medio de superficie ácida y una capa profunda ácida después de la incubación (ácida/ácida). En un período de 18 a 24 horas la concentración de la lactosa (1%).

Aún no se ha consumido y todavía existe una condición ácida, si se leyera el mismo medio después de 48 horas o más, la superficie se habría vuelto alcalina por depleción de la lactosa y la utilización de peptonas.



NO FERMENTACION DE LA LACTOSA NI DE GLUCOSA (Alcalina/alcalina; alcalina sin cambio)

Algunas bacterias, sobre todo los bacilos no entéricos Gram positivos, son incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa. Como ellas no fermentan los carbohidratos para su metabolismo, utilizan las peptonas de forma aeróbica o anaeróbica dando dos posibles lecturas en el medio de TSI. La reacción (alcalina/alcalina), se da cuando las peptonas son utilizadas tanto en forma aeróbica como en la anaeróbica. La reacción (alcalina/sin cambio) se presenta únicamente en aquellos organismos aeróbicos).

Cuando las peptonas son degradadas se produce un pH alcalino por la liberación de amoníaco (NH₃) que imparte un color rojo intenso al medio.



PRODUCCION DE GAS

La producción de gas se ve por la aparición de burbujas en el medio en la trayectoria de la punción y alrededor de ésta, los gases producidos son anhídrido carbónico e hidrógeno, la bacteria que produce gas se denomina aerogénica y puede además manifestarse por el desdoblamiento del medio, por el desplazamiento total del medio del tubo dejando un área clara, o una ligera muesca del medio en el costado del tubo. La no producción de gas se denomina anaerogénica.

2.5 PRODUCCION DE H_2S

Otro sistema de diferenciación utilizado en el medio TSI, es la producción de ácido sulfhídrico (H_2S), que se manifiesta por un ennegrecimiento del medio como resultado de la formación de sulfuro de hierro.

Bacteria (medio ácido) + tiosulfato de sodio ----- H_2S gas |

El ácido sulfhídrico es un gas incoloro; por lo que es necesario un segundo indicador para detectar en forma visible su producción.

H_2S + iones férricos ----- sulfuro ferroso (precipitado negro insoluble)

AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO (Agar T.S.I.)

El agar T.S.I. es un medio diferencial en tubo con superficie inclinada de color rojo-anaranjado, es un medio utilizado para la diferenciación tentativa de los bacilos entéricos. Contiene lactosa (1%), sacarosa (1%), glucosa (0.1%); citrato férrico y tiosulfato de sodio como indicadores de H_2S , y rojo de fenol como indicador de pH.

PROCEDIMIENTO

Utilizar un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación.

Se toca el centro de la colonia del cultivo original con un alambre recto que se hace penetrar en la capa del agar (cuidando de no puncionar hasta el fondo del tubo).

Luego se hace pasar el alambre por encima de la superficie inclinada en estrías.

Incubar a 37° C por 18 a 24 horas. Ni antes ni después .

RESULTADOS

Cuando se interpreta un resultado en el medio TSI puede observarse la combinación de cualquiera de las reacciones mencionadas a continuación, 1) Fermentación de los hidratos de carbono; 2) producción de gases (CO_2 y H_2), y 3) producción de H_2S . Registrar todas las observaciones³².

REACCIONES:

- ROJO - NARANJA ----- Tubo sin inocular (control)
 AMARILLO -Acido----- Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa.
 ROJO INTENSO ----- No fermentación de los carbohidratos (no entéricos)
 NEGRO EN EL FONDO -- Producción de H_2S
 BURBUJAS DE GAS EN EL MEDIO - Producción de gas.

CUADRO 2.14

Registro de las reacciones en el agar triple azúcar hierro

REACCIÓN	ABREVIATURAS
Acido / ácido	A / A
Acido / ácido, gas	A / A, gas
Alcalino / ácido	Alc. / A
Alcalino / ácido, gas	Alc. / A, gas
Alcalino / ácido, gas, H_2S	Alc. / A, gas, H_2S
Alcalino / ácido, H_2S	Alc. / A, H_2S
Acido / ácido, H_2S	A / A, H_2S
Alcalino/alcalino	Alc. / alc.
Alcalino/ sin cambio	Alc. /SC
Sin cambio /sin cambio	SC / SC

FUENTE: Mac Faddin, 1979.

INTERPRETACION**REACCION**

- | | |
|--|---|
| 1. Fondo ácido
Superficie ácida
Gas en el fondo
Sin color negro | Fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa con formación de ácido y gas. |
| 2. Fondo ácido
Superficie alcalina
Variable en gas
Color negro | Fermentación de glucosa, con la producción de ácido y variable en gas. Lactosa y sacarosa no fermentadas. Producción de H ₂ S. |
| 3. Fondo ácido
Superficie ácida
Variable en gas | Fermentación de glucosa, con la formación de ácido, sacarosa y lactosa no fermentadas. No producción de H ₂ S. |
| 4. Fondo ácido
Superficie ácida
Variable en gas
Color negro | Fermentación de glucosa, sacarosa o lactosa con formación de ácido y variable en gas. Producción de H ₂ S. |
| 5. Fondo alcalino
Superficie alcalina
No gas
Sin color negro | No fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa. No producción de gas. No producción de H ₂ S. |
| 6. Fondo ácido
Superficie ácida
No gas
Variable en color negro. | Fermentación de glucosa, sacarosa o lactosa con formación solamente de ácido.
No gas. Variable en la producción H ₂ S. |

CUADRO 2.15
Reacciones de los bacilos entéricos en el medio
T. S. I.

Géneros y especies	Agar inclinado	Fondo del agar	GAS	H ₂ S
<i>Escherichia</i>	A	A	+	-
<i>Shigella</i>	Alc.	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	Alc.	A	-	+
Otras <i>Salmonellas</i>	Alc.	A	+	++
<i>Arizona</i>	Alc.	A	+	++
<i>Citrobacter</i>	Alc.	A	+	++
<i>Edwardsiella</i>	Alc.	A	+	++
<i>Klebsiella</i>	A	A	++	-
<i>Enterobacter</i>	A	A	++	-
<i>E. hafniae</i>	Alc.	A	+	-
<i>Serratia</i>	Alc. o A	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A	A	+	++
<i>P. mirabilis</i>	Alc.	A	+	++
<i>P. morganii</i>	Alc.	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	Alc.	A	-	-
<i>Providencia</i>	Alc.	A	+ o -	-

FUENTE: Davidshon y Bernard, 1983.

Los tubos con agar triple azúcar hierro deben de ser examinados a las 24 horas, si se prolonga el período de incubación las reacciones ácidas pueden revertir a alcalinas (debido a la terminación de los carbohidratos fermentables con el subsecuente ataque a las peptonas a partir de las cuales se producen sustancias alcalinas (amoníaco, etc.). La pequeña cantidad de ácido producido de la glucosa es oxigenado rápidamente en el tubo el cual puede regresar a alcalino. Cuando existe una tensión baja de oxígeno en el fondo del tubo, la reacción ácida debida a la fermentación de la glucosa es mantenida.

NOTA: La lectura del medio se realiza primero en la superficie y posteriormente en el fondo del agar.

3. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

3.1 PRUEBA DE CAMP - ESCULINA

FUNDAMENTO:

la reacción de CAMP es útil para diferenciar al Streptococcus agalactiae de otras especies de Streptococcus; la prueba se fundamenta en la capacidad, de este microorganismo, para completar la lisis parcial de los hematíes producida por la hemolisina beta de una cepa de Staphylococcus. Pueden dar reacciones positivas, en ocasiones, las cepas de Streptococcus dysgalactiae y Streptococcus uberis, esta última especie desdobla la Esculina, mientras que la primera y el S. agalactiae no lo hacen¹⁶.

MEDIO DE PRUEBA

El medio utilizado consiste en una caja con agar sangre al que se le adiciona 0.1% de Esculina y 0.01% de Citrato férrico.

PROCEDIMIENTOS

Técnicas alternativas

Método 1

- Trazar una línea a través del centro de la caja de agar sangre.
- Sembrar en estría continua el cultivo de Streptococcus en ángulo recto cruzando la línea.
- Inocular un cultivo puro de Staphylococcus aureus cruzando la superficie del agar paralelamente a la línea inicial.
- Incubar a 37° C por 18 a 24 horas, y examinar.

RESULTADOS

Si el Streptococcus pertenece al grupo B, produce una característica zona de hemólisis beta, semicircular, dentro de la zona hemolizada por las toxinas del Staphylococcus aureus.

Método 2

- Se requiere de un cultivo de Staphylococcus aureus, capaz de producir una zona amplia de beta hemólisis, de la cual se siembra una línea recta que abarque la superficie del agar.

PRUEBA DE CAMP - Esculina UTILIZANDO UNA ESTRIA DE Staphylococcus aureus.

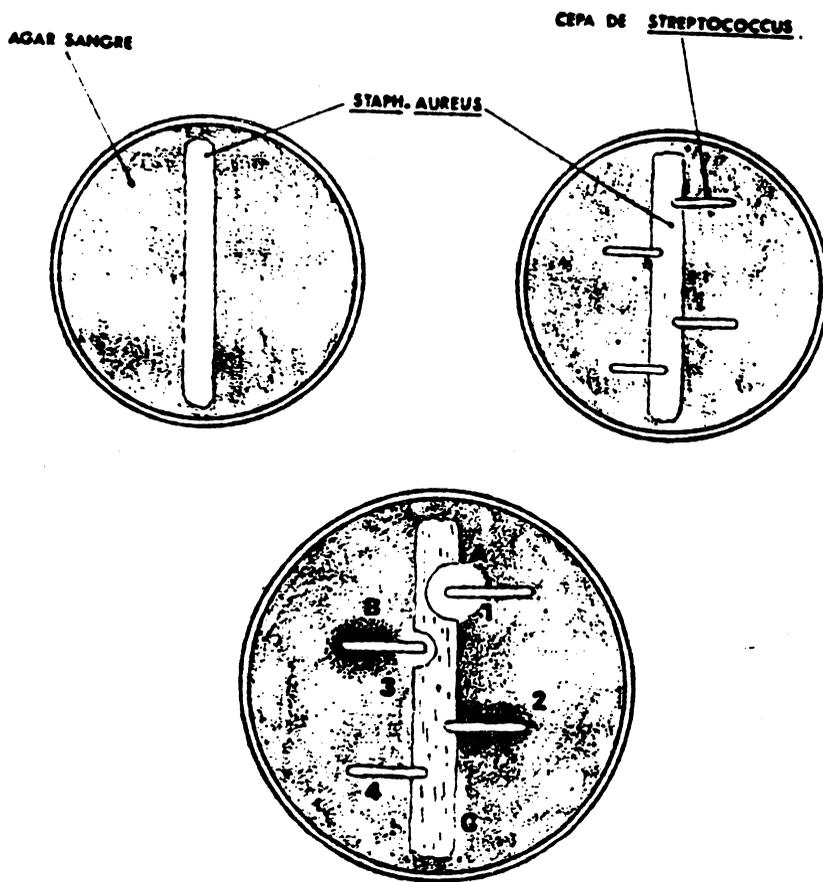


Fig. 2.35 Diferenciación de Streptococcus en la prueba de CAMP - Esculina (Ver página siguiente para su interpretación)

- La cepa de Streptococcus es sembrada perpendicularmente a la línea de inoculación del Staphylococcus, a unos 2 o 3 mm de ésta. Un cultivo conocido de Streptococcus agalactiae deberá incluirse en cada prueba como control (Ver Fig. 2.35).
- Incubar las cajas a 37° C durante 18 a 24 horas, y examinar.

Interpretación. La reacción positiva a CAMP se manifiesta por una zona semicircular de lisis completa dentro de la zona de la beta hemólisis producida por el Staphylococcus, el oscurecimiento del medio alrededor del Streptococcus corresponde a la separación de la Esculina⁴⁶. (Ver Fig. 2.35).

Prueba de CAMP. (Christie, Atkins y Much-Petersen, 1944).

- Preparar una caja con base para agar sangre, cubriendo esta capa con una capa de la misma base + 10% de glóbulos rojos de carnero.
- Inocular el cultivo de prueba durante 18 a 24 horas
- Después de la incubación, y en la estufa bacteriológica para evitar el enfriamiento, adicionar 0.02 a 0.04 ml (2 gotas) de toxina B-estafilocócica (10 unidades por ml) en el área de colonias discretas, y continuar la incubación por 2 horas más.

RESULTADOS

Una zona clara en el medio, alrededor de las colonias cubiertas por la B-toxina, es una prueba positiva a CAMP¹⁸.

INTERPRETACION DE LA PLACA DE CAMP.

A-Reacción positiva a CAMP

B-Oscurecimiento del medio por la separación de la esculina.

C-Zona de beta hemólisis por es Staphylococcus.

1. Cultivo CAMP (+) Esculina (-).
2. Cultivo CAMP (-) Esculina (+).
3. CAMP (+); Esculina (+)
4. Cultivo CAMP (-) Esculina (-).

CUADRO 2.16
Características de los Streptococcus causantes de mastitis en la prueba de CAMP

ORGANISMO	CAMP	ESCULINA	HEMOLISIS
Str. agalactiae	+	-	α, β o ninguna
Str. dysgalactiae	-	-	α o ninguna
Str. uberis	-	+	α o ninguna

+) Pueden encontrarse cepas de Str. agalactiae CAMP (-)

“) Pueden encontrarse cepas de Str. uberis CAMP (+)

3.2 REQUERIMIENTOS DE LOS FACTORES X y V

FUNDAMENTO:

Es una prueba que se utiliza para la identificación y diferenciación de los miembros del género Haemophilus¹¹.

El género Haemophilus, está restringido a las bacterias que requieren de uno o ambos factores, "X" (hemina o hematina) y "V" (coenzima I; difosfopiridín - nucleotido = NAD) para su crecimiento¹³.

Las especies de Haemophilus no sólo son exigentes en sus requerimientos de X y V sino que también necesitan de algunos constituyentes de la sangre o del suero. Para obtener resultados consistentes en estas pruebas es esencial el empleo de un inóculo pequeño (para evitar el transporte). La necesidad para el CO₂ no es tan marcada para este género, por lo que el "efecto del CO₂" no ha recibido una consideración seria¹⁸ (Boyce, frazer, 1969).

PROCEDIMIENTOS GENERALES

PREPARACION DE LOS FACTORES X y V (Marshal y Kelsey, 1960).

FACTOR X (hemina o hematina). Centrifugar los glóbulos rojos de 40 ml de sangre y agregar, agitando constantemente, 100 ml de acetona conteniendo 1.2 ml de HCL conc. filtrar y agregar de 100 a 120 ml de agua al filtrado para precipitar la hemina. Colectar por filtración y lavar con agua. Disolver la hemina cruda en 25 ml de solución de Na₂HPO₄ -0.1 M y esterilizar a 115° C durante 10 minutos¹⁸.

FACTOR V (Difosfopiridín - nucleotido = NAD). Suspender 50 g de levadura en 100 ml de solución de KH₂PO₄-0.2 M y calentar a 80° C durante 20 minutos. Clarificar por centrifugación y esterilizar el sobrenadante por filtración. Conservar en refrigeración o en congelación.

DISCOS DE FACTORES X, V y X + V. Cortar en discos de aproximadamente 10 mm de diámetro papel filtro (tal como el Whatman No. 3 u otro papel adecuado absorbente). Sumergir los discos en solución de los factores X, V, o una mezcla de los factores X y V. Escurrir a 37° C o liofilizar. Conservar en un recipiente cerrado en refrigeración¹⁸.

3. TECNICA

Método 1

- Inocular una placa de agar sangre y una placa de agar nutritivo con el microorganismo e inocular por sitios múltiples en la superficie de ambas placas una cepa de Staphylococcus aureus.
- Observar cada placa para crecimiento y "Satelitismo".

Método 2

- Trazar una línea a través del centro de una placa de agar sangre y una

- de agar nutritivo.
- Inocular en estría el cultivo de Haemophilus en ángulo recto y cruzando la línea en ambos medios.
- Sembrar un cultivo de Staphylococcus aureus cruzando la placa paralela-mente a la línea (Ver Fig. 2.36-A).
- Incubar ambas placas a 37° C por 18 a 24 horas y observar para creci-miento y "satelitismo".

RESULTADOS (para el Método 1 y 2):

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Crecimiento únicamente en la placa de agar sangre. | --Requiere del factor X |
| 2. El crecimiento muestra "sate-litismo" en el agar sangre. | --Requiere de los factores X y V |
| 3. Muestra "satelitismo" en am-bos medios. | --Requiere del factor V |
| 4. Crecimiento en ambos medios pero no muestra "satelitismo" | -- No requiere de factor X ni V |

NOTA: Para los métodos mencionados anteriormente, la cepa de Staphyloco-ccus aureus, actúa como donador del factor "V". El factor "X" lo proporciona el agar sangre¹⁸.

Método 3

- Inocular una placa de agar nutritivo y colocar un disco de factor X y otro de factor V en la superficie a una distancia aproximada de 2 cm uno de otro (Ver Fig. 2.36-B).
- Examinar para crecimiento en las cercanías de uno o ambos discos.

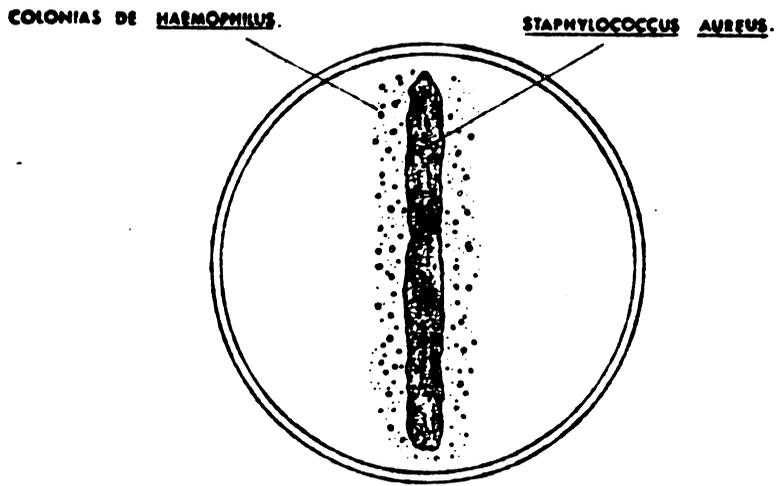


Fig. 2.36-A Prueba para "satelitismo" utilizando una placa de agar sangre.

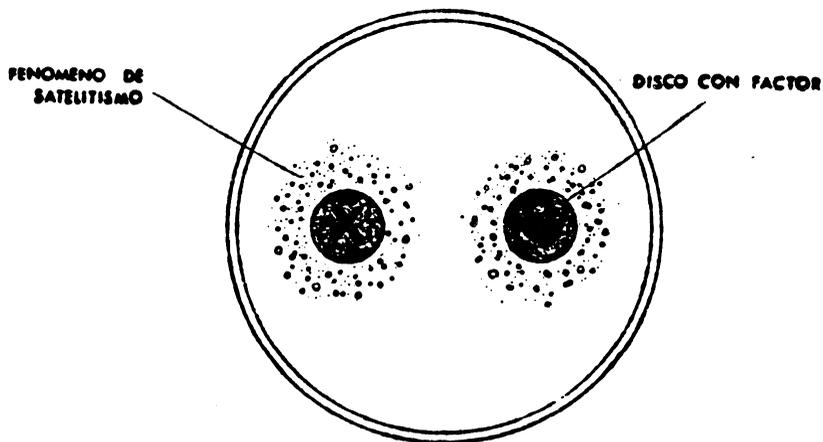


Fig. 2.36-B Utilización de discos impregnados con los factores X y V en una placa de agar nutritivo.

CUADRO 2.17
Identificación del género Haemophilus

PRIMER CUADRO PARA HAEMOPHILUS

A: Que requieren X y V

	Hemólisis	CO ₂	Requiere suero
H. influenzae	-	-	-
H. suis	-	-	+
H. haemolyticum	+	-	-
H. gallinarum	-	+	+

SEGUNDO CUADRO PARA HAEMOPHILUS

B: Que requiere solo X

	Catalasa	Hemólisis	CO ₂	Indol
H. haemoglobinophilus	+	-	-	+
H. influenzae murium	-	-	-	-
H. aphrophilus	+	-	+	-
H. ducreyi	.	+	+	-

TERCER CUADRO PARA HAEMOPHILUS

C: Que requiere solo V

	Catalasa	Hemólisis	CO ₂	Indol
H. parainfluenzae	+	-	-	-
H. parahaemolyticus	+	+	-	d
H. para gallinarum	-	-	+	-
H. paraphrohaemolyticus	+	+	+	d

FUENTE: Pijoan, Ciprian y Lastra, 1978.

3.3 PRUEBA DE LA COAGULASA

FUNDAMENTO:

comprobar la facultad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. La prueba de la coagulasa se utiliza de manera específica en la diferenciación de especies pertenecientes al género Staphylococcus: S. aureus (+) del S. epidermidis (-). Una reacción positiva a la coagulasa es de criterio diagnóstico final para la identificación del Staphylococcus.

Frecuentemente esta prueba es utilizada como índice de virulencia o patogenicidad⁴¹.

BASES BIOQUÍMICAS

La prueba de la coagulasa fue desarrollada a partir de las observaciones de que ciertos Estafilococos coagulaban el plasma de ganso (Loeb, 1903), humano, de caballo y de ovino (Much, 1908)¹⁸.

Se desconoce el mecanismo exacto y la estructura química de la coagulasa. Sin embargo, Gratia (1920) introdujo el nombre estafilocoagulasa para el agente activo, la cual, está constituida por dos sustancias, la coagulasa ligada (ligada a la célula) y coagulasa libre⁴¹.

Smith y Col. (1968) sugieren que la coagulasa es una sustancia semejante a la protrombina que reacciona con los factores plasmáticos normales para formar un compuesto parecido a la trombina que, a su vez, activa el fibrinógeno para formar fibrina.

Plasma $\xrightarrow[\text{coagulasa}]{\text{bacteria}}$ coágulo de fibrina

La coagulación del plasma se produce en dos etapas: 1) hay una reacción entre la enzima producida por las bacterias, una procoagulasa, con un factor o activador presente en el plasma para formar coagulasa, y 2) la propia coagulación del plasma activada por la coagulasa. El factor bacteriano verdadero es la procoagulasa, y el factor plasmático es una fracción globulínica similar, pero no idéntica, a la protrombina.

La coagulasa ligada se detecta con el método del portaobjetos, la reacción de aglutinación del plasma, y no está presente en filtrados de cultivo. El método de la prueba de la coagulasa en tubo detecta tanto la coagulasa libre como la ligada.

La actividad de la coagulasa es independiente de otras toxinas estafilocócicas que pueden ser producidas por el S. aureus; no obstante, Cowan asegura que todas las cepas de S. aureus coagulasa positivas producen alfa o beta hemólisis, o ambas⁴¹.

REACTIVOS

PLASMA

Recomendado: humano o de conejo.

Alternativas: de caballo, carnero o bovino

FIBRINOGENO

Estéril o fresco

PREPARACION

Plasma fresco de sangre entera.

- Dejar que los glóbulos rojos sedimenten o centrifugar la sangre completa.
- Asépticamente, quitar el sobrenadante (plasma) que contiene el anticoagulante en un recipiente estéril.

Fibrinógeno fresco.

- Asépticamente retirar el plasma que contiene anticoagulante de la sangre entera.

Precipitación de fibrinógeno de plasma fresco citratado.

- Mezclar volúmenes iguales de plasma y una solución saturada de cloruro de sodio, dejar que se precipite el fibrinógeno y centrifugar.
- Reconstituir el fibrinógeno precipitado hasta 5 veces su volumen con agua destilada estéril y almacenar.
- El fibrinógeno resulta efectivo tanto para el método del portaobjetos como el del tubo, aún diluido hasta 1: 60.

NOTA: Existen productos comerciales, los cuales son reconstituidos en la cantidad necesaria para su uso diario. No se recomienda guardar en frascos con plasma rehidratado⁴¹.

PROCEDIMIENTOS

PRUEBA EN PORTAOBJETOS (Coagulasa ligada)
(Williams y Harper, 1946)

TECNICA

Colocar una gota de agua destilada o solución salina fisiológica estéril en un portaobjetos limpio.

Con el mínimo de extensión, emulsionar una colonia de Staphylococcus en la gota de agua destilada hasta producir una suspensión densa.

Mezclar suavemente la cantidad recogida con un asa impregnada con plasma, en la suspensión de bacterias.

Observar la inmediata formación de un precipitado macroscópico en forma de aglutinados blancos.

RESULTADOS

Una especie coagulasa (+) da por lo general una reacción entre los 5 y 20 segundos. La formación retardada de grumos no constituye una reacción positiva (Ver Fig. 2.37).

Se considera negativa la prueba en portaobjetos si no se produce la coagulación a los 3 a 4 minutos.

La prueba de la coagulasa en portaobjetos es un método únicamente presuntivo y todos los resultados negativos o retardados (más de 20 segundos) deben ser confirmados con la prueba en tubo de ensayo.

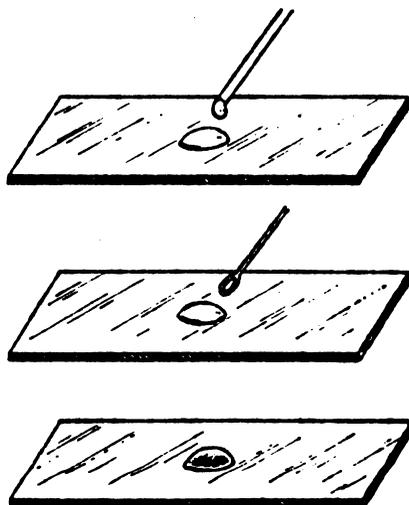


Fig. 2.37 Determinación de la Coagulasa ligada en portaobjetos.

PRUEBA EN TUBO DE ENSAYO (Coagulasa ligada y libre)

Método 1 (Cowan, 1938).

TECNICA

- Mezclar 0.5 ml de plasma humano o de conejo no diluido con un volumen igual de un cultivo de Staphylococcus en caldo BHI de 24 horas, o recoger con el asa una buena cantidad de una colonia pura de una placa de agar.
- Incubar a 37° C durante 4 horas, observar cada 30 minutos si se produce coagulación.

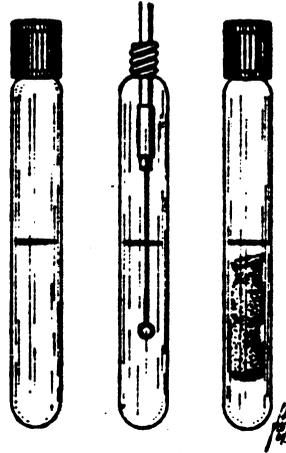


Fig. 2.38 Prueba en tubo de ensayo para la determinación de la coagulasa ligada y libre. Prueba positiva.

Cowan sugiere utilizar plasma sin diluir con el cultivo en caldo, pero diluirlo en la proporción de 1:2 cuando se hace una suspensión con una so la colonia, Gillespie recomienda una dilución de 1:10 del plasma¹⁸.

Método 2 (Gillespie, 1943)

TECNICA

- A 0.5 ml de una dilución 1:10 de plasma en solución salina, se agrega 0.1 ml de un cultivo de 18 horas del microorganismo en caldo.
- Incubar a 37° C y examinar para formación de coágulo a 1, 3 y 6 horas después.

RESULTADOS DE METODO 1 y 2

Prueba positiva: se forma coágulo o filamentos de fibrina definidos.

Completa: el coágulo abarca todo el tubo (Ver Fig. 2.38).

Parcial: el coágulo no se extiende por toda la columna. Cualquier grado de coagulación se considera positivo.

Prueba negativa: no hay formación de coágulo, la suspensión se mantiene homogénea.

NOTA: La concentración de Estafilocagulasa influye sobre la velocidad de coagulación del plasma; cuanto más alta la concentración, más rápidamente se formará el coágulo, una concentración elevada provoca la instantánea coagulación del plasma.

Las cepas de S. aureus más virulentas poseen enzimas coagulasa. Se recomienda que no se use la presencia o ausencia de coagulasa como criterio de virulencia; los síntomas clínicos son de mayor importancia para determinar la patogenicidad.

CUADRO 2.18
Diferenciación de las especies del género
Staphylococcus

REACCIÓN	<u>S. aureus</u>	<u>S. epidermidis</u>
Coagulasa	+	-
Manitol	+	D
Reacción OF (O)	+	-
Reacción OF (F)	+	-
Alfa toxina	+	-
Endonucleasas termoresistentes	+	-
Biotina para su crecimiento	-	+

FUENTE: Pijoan, Ciprian y Lastra, 1978.

D.- Diferentes tipos bioquímicos.

D. AISLAMIENTO DE ANAEROBIOS

Las bacterias se clasifican en varias categorías de acuerdo a su habilidad de crecar en presencia de oxígeno molecular. Aquellas que requieren de libre acceso de aire son conocidas como aerobias, las cuales, en condiciones de tensiones reducidas de oxígeno crecen débilmente o no lo hacen, sin embargo la mayoría de las bacterias que utilizan el oxígeno atmosférico pueden crecer bien en su ausencia, ya que son capaces de utilizar el oxígeno combinado para sus procesos de síntesis, éstas reciben el nombre de anaerobios facultativos.

Los anaerobios estrictos tienen la particularidad de crecer solamente en ausencia completa de oxígeno, ya que es perjudicial para estos microorganismos (por carecer de peroxidasa), al no presentar peroxidasa, no son capaces de desdoblar los metabolitos tóxicos para ellas mismas y que son el resultado de las reacciones de dichas bacterias en presencia de oxígeno.

Un grupo relativamente pequeño de bacterias tiene la característica de crecer únicamente en tensiones reducidas de oxígeno, debido a estos requerimientos mínimos de gas (10% de CO_2) a este grupo se le ha denominado bacterias microaeroflicas⁴⁰.

1. RECOLECCION DE MUESTRAS

Todas las muestras utilizadas para el estudio de los microorganismos anaerobios deben examinarse o cultivarse tan pronto como sea posible después de su obtención con el objeto de evitar la pérdida de su viabilidad.

Los indicios que sugieren posible infección por bacterias anaerobias son:⁴⁹

- Descargas mololientes.
- Tejidos necróticos, gangrena o formación de pseudomembranas.
- Presencia de gas en tejidos y secreciones.
- Endocarditis con hemocultivo negativo.
- Infecciones relacionadas con la administración de aminoglucosidos (por vía oral, parenteral o tópica).
- Cuadros típicos de edema maligno, tétanos o carbón sintomático en los animales.
- Aborto séptico.
- Infecciones subsecuentes a heridas (mordeduras, heridas por esquila o traumatismos).
- Presencia de "granulos de azufre" en exudados (frecuentes en gabarro y actinomicosis).
- Infecciones relacionadas con destrucción tisular asociados con trastornos circulatorios.

Las muestras pueden consistir en un trozo de órgano o tejido, o bien, se recomienda recoger el espécimen por aspiración con jeringa y aguja estéril protegiéndola del contacto del aire (doblando la aguja), o insertándola en un trozo de caucho en el caso de exudados o líquidos⁴⁹.

Los tubos para el cultivo de sangre pre-reducida (tipo Vacutainer), son ideales para este tipo de muestra, estos tubos son suplementados con caldo peptona y CO₂, y son un método bastante económico para coleccionar sangre con un dispositivo de salida adicional que permite aumentar el bióxido de carbono en el interior de los tubos. Se recomienda adicionar a estos tubos penicilinas a la cual, permite el cultivo de muestras provenientes de pacientes con tratamiento de penicilina⁵⁴.

Las muestras son remitidas al laboratorio lo más rápido posible (20 a 30 min. como máximo), sin utilizar refrigerantes, el uso de hisopos para la obtención de este tipo de muestras no es recomendable, a excepción de las muestras de heces⁴⁰.

Si el retraso en el envío de las muestras es inevitable, se recomienda su colección en tubos con un medio pre-reducido (caldo tioglicolato o medio de transporte de Stuart), pueden utilizarse jarras anaerobias (como la jarra Gaspak), o algún otro sistema similar en el caso de órganos. Cualquiera que sea el método -- utilizado para la remisión de muestras al laboratorio, tiene la finalidad de evitar el contacto del microorganismo con el oxígeno atmosférico⁹.

2. IDENTIFICACION PRELIMINAR DE ANAEROBIOS POR DEMOSTRACION DIRECTA

Las bacterias anaerobias juegan un importante papel tanto en medicina humana como en medicina veterinaria; las encontramos provocando varias enfermedades, son extremadamente patógenas por lo que deben manejarse las muestras sospechosas con sumo cuidado.

La morfología típica de muchos anaerobios es una guía valiosa para la selección de medios y técnicas de aislamiento especiales, el examen directo utilizando la tinción de Gram o el método de Schaeffer y Fulton, pueden ser de gran ayuda en la identificación preliminar de algunos géneros⁵⁵ (Ver cuadro 2.19).

3. MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO PRIMARIO

Aunque no se considera conveniente para el aislamiento de anaerobios muy exigentes, uno de los medios más utilizados para el cultivo de estos microorganismos, sigue siendo el medio líquido de tioglicolato (introducido por Brewer, 1940). El tioglicolato sódico ($\text{HSCH}_2\text{COON}_2$) contenido en este medio, mantiene las condiciones de reducción necesarias para el desarrollo bacteriano, mediante la absorción del oxígeno disuelto en el medio^{9, 54}.

CUADRO 2.19
 Algunas características de los principales géneros anaerobios

G E N E R O	REACCION AL GRAM	M O R F O L O G I A
Actinomyces	+	Bacilos delgados filamentosos o ramificados (parecidos a <u>ni</u> celios).
Bacteroides	-	Bacilos delgados con puntas - redondeadas; en algunas oca- siones adoptan forma de coco- bacilos o pleomórficas.
Clostridium	+	Bastones grandes, anchos; o - bacilos pequeños que pueden - presentar esporas.
Eubacterium	+	Bacilos en pares o cadenas -- cortas; formas pleomórficas.
Fusobacterium	-	Bastones delgados rematados - punta; frecuentemente son --- pleomórficos.
Lactobacillus	+	Bacilos en cadena (común); -- formas pleomórficas.
Peptococcus	+	Cocos en pares o formando ca- denas cortas.
Peptostreptococcus	+	Cocos simples, en pares o for- mando cadenas.
Propionibacterium	+	Pleomórficos; bacilos delgados formando grandes masas.
Veillonella	-	Cocos en pares, cadenas cortas o en masas irregulares.

FUENTE: Willis, A. T., 1977

Para el aislamiento primario, es conveniente agregar al medio una pequeña cantidad de agar, el cual, limita la convección y, por lo tanto, reduce la absorción del oxígeno presente en el aire. El tioglicolato sódico reacciona con el oxígeno y mantiene las enzimas de las células en forma reducida (evitando la producción de metabolitos tóxicos para la bacteria). Este medio no necesita sellarse y además puede prepararse para ser presentado en placas⁵⁴.

Existen otras sustancias reductoras que incluidas en los medios de cultivo (tubos o placas) para anaerobios, pueden ser utilizadas en ausencia o junto con el tioglicolato sódico), la cisteína, el ácido ascórbico, la glucosa, o bien, las limaduras de hierro reducido (comercial o por calentamiento), son las que más uso tienen en los laboratorios de diagnóstico⁵⁵ (Ver cuadro 2.20).

El medio de carne cocida de Robertson y la leche con tornasol, son también presentaciones en tubo, que pueden obtenerse en forma deshidratada y que son de gran utilidad para el cultivo y caracterización de los anaerobios (principalmente para el género Clostridium). Antes de emplear estos medios, deberán calentarse en un baño hirviendo durante 10 a 15 min., para expulsar todo el oxígeno disuelto en el medio (si los medios son de preparación reciente, o se han hervido recientemente, no es necesario cubrirlos con Vaspar)⁵⁴.

Cuadro 2.20
Agentes reductores utilizados en los medios
para anaerobios

AGENTE	CONC. USUAL (%)
Acido tioglicolico	0.01 - 0.2
Glucosa	0.5 - 1.0
Sulfito de sodio	0.025
Acido ascórbico	0.1
Cisteína	0.5

FUENTE: Willis. A. T., 1977.

La mayoría de los anaerobios patógenos, tales como el Ci. tetani, Ci. perfringens y el Ci. botulinum, producen esporas resistentes al calor hasta un grado capaz de destruir todas las bacterias vegetativas. A menudo es posible, al intentar cultivar estos anaerobios a partir de heces, de alimentos sospechosos o compresas de heridas, inocularlos en tioglicolato líquido, carne cocida, o en tubos con agar profundo, luego se pone el cultivo en un baño de agua a 75° C durante 10 a 15 min., lo cual destruirá todas las formas vegetativas (aerobias o anaerobias), y las esporas se generarán a temperatura de incubación (37° C), para luego desarrollarse. Puede tenerse más éxito con este método que con los cultivos realizados en placas¹⁹.

El empleo del agar yema de huevo utilizando el sistema de doble caja, las jarras anaeróbicas o bien las campanas de anaerobiosis; nos permite determinar la reacción de lecitinasa y lipasa (reacción de Nagler, 1939), producida por el género Clostridium. Además, favorece el desarrollo de esporas de los bacilos Gram positivos¹⁸.

REACCION DE NAGLER:

La lecito - vitelina (LV) es el componente lipoprotéico de la yema de huevo y -- puede obtenerse como un líquido amarillo claro por la mezcla de la yema de huevo con la solución salina.

Producción de lecitinasa: la lecito - vitelina se vuelve opalescente cuando se mezcla con ciertas toxinas bacterianas o lecitinasas; pudiendo ocurrir posteriormente la floculación y separación de una capa gruesa de grasa. Cuando los microorganismos formadores de lecitinasa se desarrollan en un medio sólido conteniendo LV, la lecitinasa se difunde en el agar y produce una zona de opalescencia al

redor de las colonias aisladas constituida de un diglicerido de fosforil clorina 18, 55. (Ver Fig. 2.39).

Producción de Lipasa: los microorganismos lipolíticos también producen opalescencia en el agar con LV, la cual se observa como una zona de iridiscencia "aperlada" sobre y alrededor de las colonias, así como una zona de opacidad debajo de las colonias debido a la insolubilidad de los ácidos grasos liberados o formados por lipasa³². (Ver Fig. 2.40).

La capacidad para producir opacidad en el agar LV es útil en la división del género Bacillus y Clostridium, pero otros microorganismos, tales como Staphylococcus aureus, pueden dar reacciones positivas^{18, 55}. (Ver cuadro 2.21).

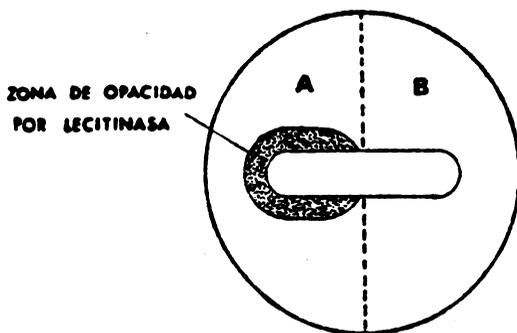


Fig. 2.39 Producción de Licitinasa: A) Cl. perfringens sobre agar yema de huevo, mostrando opalescencia. B) Cl. perfringens en el mismo medio conteniendo antitoxina.

Cuadro 2.21

Reacción de algunos Clostridium de interes
Veterinario en el Agar LV

Especie	Lecitinasa	Lipasa	Morfología del espora
haemolyticum	+	-	ovoide (ST)*
botulinum	-	+	ovoide (E)
sordellii	+	-	ovoide (E)
tetani	-	-	redondo (T)
histolyticum	-	-	ovoide (ST)
chauvoei	-	-	ovoide (E)
septicum	-	-	ovoide (E)
novy	+	-	ovoide (E)
perfringens	+	-	ovoide (C)

*) . C = central

E = excéntrico

ST = subterminal

T = terminal

FUENTE: Jang, Bibarstain y Barajas, 1974. Oswaldiston, G. W., 1983.

Las placas de agar sangre, el agar de infusión cerebro y corazón (BHI)+ sangre, y el agar sangre lacada (congelada y descongelada); son algunos medios no selectivos, pero que son de bastante aceptación para el cultivo de anaerobios formadores de esporas. La placa de Brewer (Ver Fig. 2.41) está especialmente ideada para el uso de estos medios sólidos, esta caja tiene la finalidad de eliminar el oxígeno y permitir al mismo tiempo el cultivo en superficie; el oxígeno contenido en el pequeño espacio aéreo encima del agar se elimina mediante la reacción del agente reductor utilizando, o bien, las placas ya inoculadas se colocan en jarras anaeróbicas o en otro recipiente especial (velobiosis o incubador anaeróbico). El agar yema de huevo, el agar dextrosa tripticasefina o el medio de triplicasa soya, son también utilizados en la preparación de estas cajas ⁵⁴.

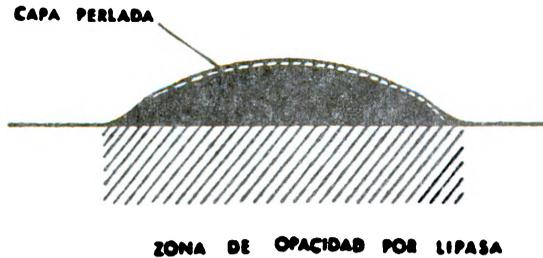


Fig. 2.40 Colonia lipolítica sobre agar yema de huevo mostrando un área de opacidad restringida y una capa perlada.

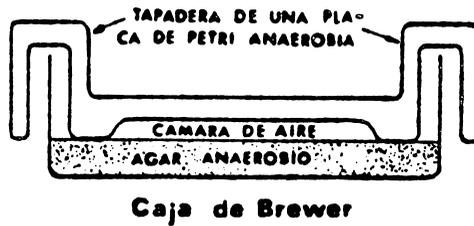


Fig. 2.41 Placa de Brewer.

4. METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS PARA EL AISLAMIENTO DE ANAEROBIOS

Normalmente las bacterias anaerobias pueden desarrollarse y crecer en una atmósfera que presente un 100% de nitrógeno; sin embargo, algunos microorganismo (como Brucella o Bacteroides), requieren de una atmósfera menos estricta que contenga un 10% de CO_2 .

Para el aislamiento y estudio de las bacterias anaerobias son necesarios métodos especiales; en esencia hay tres tipos de procedimientos utilizados para la obtención de una atmósfera libre de oxígeno: a) El empleo de medios que contengan - sustancias reductoras que eliminen el oxígeno del medio; b) el empleo de medios y técnicas en que puede excluirse el oxígeno del medio, y c) el empleo de jarras, placas o incubadores anaerobios, en los cuales puede retirarse el oxígeno (aire) y sustituirse por hidrógeno o nitrógeno^{19, 56}.

La efectividad del procedimiento de anaerobiosis empleado, puede ser comprobada por medio de la inclusión de agentes indicadores de oxidación - reducción, en los recipientes en los que debió ser removido el oxígeno libre, también pueden incluirse en los medios de cultivo⁴⁰.

Para asegurarse a simple vista que las condiciones anaerobias son adecuadas puede emplearse la solución indicadora descrita a continuación:

Indicador de Fildes y McIntosh (1921).

Soluciones:

- NaOH 0.1 N, 6 ml; agua destilada hasta 100 ml.
- Azul de metileno, 3 ml, al 0.5% en solución acuosa; agua destilada hasta 100 ml.
- Glucosa, 6 g; agua destilada hasta 100 ml.

Colocar volúmenes iguales de cada solución en un tubo de ensayo, añadir un cristal de timol pequeño y hervir hasta que la solución quede incolora, colocar en el recipiente utilizado para obtener una atmósfera anaerobia. La solución permanece incolora si se han mantenido las condiciones anaerobias. Existen en el mercado indicadores de óxido - reducción desechables^{19, 55}.

Cuadro 2.22

Indicadores de oxidación-reducción

INDICADOR	APARIENCIA	
	Oxidación	Reducción
Azul de metileno	azul	incoloro
Resazurina	rojo	incoloro

En los laboratorios de bacteriología general, pueden realizarse trabajos de aislamiento bastante aceptables utilizando técnicas simples (como el sistema de do-

ble caja o utilizando el método del pirogalol alcalino), o bien, empleando las -
jarras anaeróbicas que se encuentran en el mercado.

La finalidad del procedimiento utilizado para el cultivo de anaerobios, es reem-
plazar el oxígeno libre, o reemplazarlo por otro gas y los podemos clasificar de
la siguiente manera: ⁴⁰

TECNICAS FISICAS

- Sembrado en un medio sólido por picadura.
- Ebullición del medio que se va a emplear, antes del sembrado.
- Tubos de rollo.
- Cámaras de anaerobiosis: funcionan por evacuación - reemplazo, son metálicas y el catalizador que emplean es paladio o aluminio.
- Jarra de Brewer: es de cristal, funciona por evacuación reemplazo y su catalizador es el asbesto platinizado activado por la electricidad.
- Jarra de McIntosh - Fildes: es metálica, funciona por evacuación reemplazo y sus catalizadores son el paladio y el aluminio.

TECNICAS QUIMICAS

- Jarra de Gas-Pak: es de plástico y su catalizador es el paladio. Utiliza el método del sobre nebulizador.
- Utilización de medios PRAS (pre-reduced anaerobically sterilized), son medios comerciales sólidos o líquidos prerreducidos y esterilizados anaeróbicamente.
- Caldo tioglicolato: es un medio nutritivo que contiene tioglicolato de sodio como agente reductor y un indicador de óxido - reducción.
- Compuestos químicos que eliminan el oxígeno libre al combinarlo, ejemplos:

Pirogalol + carbonato de sodio

Cistefna + ácido clorhídrico

Acido ascórbico + glutatona

A continuación, describiremos algunos de los métodos más utilizados en el aislamiento de los microorganismos anaerobios, en un laboratorio de Bacteriología general.

4.1 JARRAS ANAEROBICAS

a. JARRA DE TORBAL (JARRA BTL).

Las jarras anaeróbicas más utilizadas en la mayoría de los laboratorios bacteriológicos, son los tipos modificados del modelo original diseñado por McIntosh y Fildes (1916).

La jarra BTL (Bair y Tatlock (London), 1958) es una vasija de metal. La jarra y su ceja (que se asienta sobre un anillo junta de hule) están fabricadas de cobre y esmaltadas en el exterior, con un barniz de estaño/niquel en el interior. La tapa está prensada a la vasija y tiene ésta última un brazo lateral que posee un indicador capsular del potencial de óxido - reducción que debe utilizarse --- (Ver Fig. 2.42). Los tipos antiguos de estas jarras requieren de un catalizador (platino o paladio) calentado mediante un mechero de Bunsen, el cual se encarga de catalizar la reacción del oxígeno con el hidrógeno para formar agua (principio original aplicado para el cultivo de bacterias anaerobias por Laidlaw, 1915). Posteriormente, estos catalizadores fueron modificados y se utilizaron los catalizadores calentados electrónicamente (Brewer, 1938) y los catalizadores en frío (Brown, 1922)⁵⁵.

Más recientemente, se introdujeron los catalizadores que trabajan a temperatura ambiente (Heller, 1954), estos consisten en pequeñas pelotitas de aluminio contenidas en un saquito fino de paladio (la jarra BTL utiliza este tipo de catalizador).

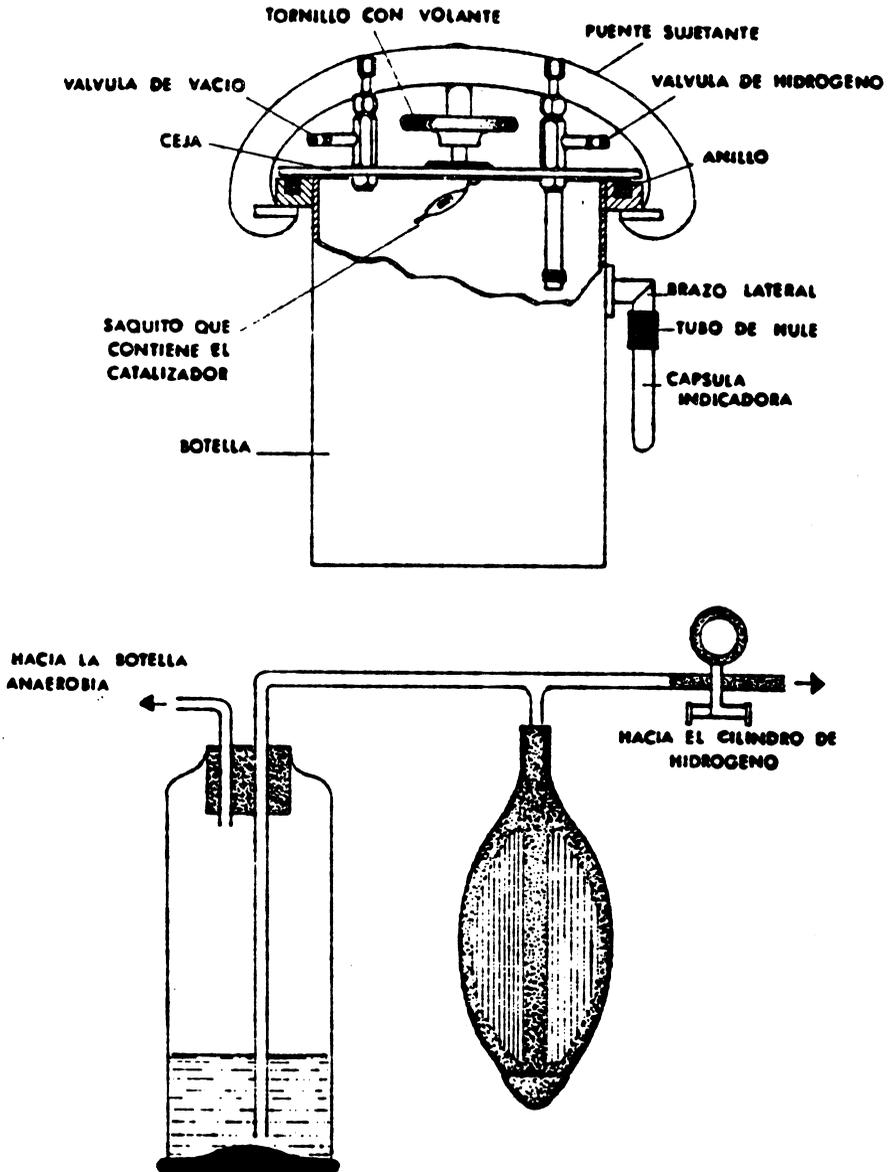


Fig. 2.42 Jarra de Torbal.

Para hacer funcionar la jarra, se colocan las placas o tubos que van a ser incubados en el interior de la vasija. El hidrógeno se introduce (utilizando un aparato Kipp) y la concentración deseada es regulada mediante un manómetro. Existen en el mercado cilindros que contienen gas hidrógeno disponible, así como --- bióxido de carbono, el gas debe circular hacia la jarra a través de una válvula reductora o empleando una cámara de látex como reservorio de presión baja, cualquiera que sea el reservorio, deberá pasarse el gas a través de una botella aspiradora³³ (Ver Fig. 2.42).

b. SISTEMA ANAEROBICO GAS-PAK (Brewer y Allegreier, 1966)

Este sistema fue diseñado para utilizarse en la jarra Gaspak (hecha de plástico policarbonato transparente) o en la jarra de cristal de Brewer⁹.

La jarra Gaspak utiliza un catalizador a temperatura ambiente, un indicador de - Rh y un paquete de gas hidrógeno desechable con envoltura generadora de bióxido de carbono. La introducción de este sistema, elimina la necesidad de utilizar - una bomba de vacío, del cilindro de gas y del manómetro³³.

La jarra no presenta conexión externa y está construida de tal forma que la pinza liberará cualquier exceso de presión como medida de seguridad (Ver Fig. 2.43).

Los sobres Gaspak contienen dos tabletas, una compuesta de ácido cítrico y bicarbonato de sodio y la otra de borhidrato de sodio y cloruro de cobalto. El generador es activado cuando se añade agua a la jarra, la cual, debe cerrarse inmediatamente⁵⁵.

Los sobres disponibles en el comercio, que liberan el hidrógeno y el CO₂ al añadirles agua, pueden ser utilizados con cualquier sistema anaerobio que emplee un

catalizador de platino o paladio^{51, 54}.

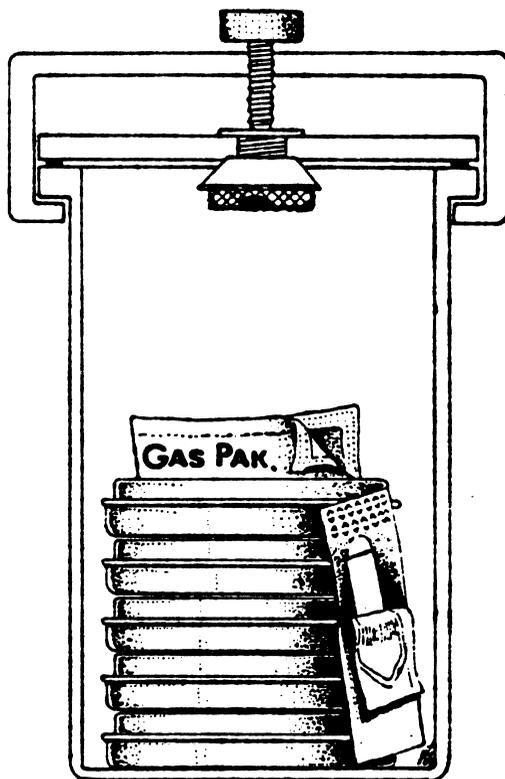


Fig. 2.43 Sistema anaerobio Gaspak.

Recientemente, Don Whitley Scientific produjo un nuevo generador de Hidrógeno - Bióxido de carbono para ser utilizado en estas jarras anaeróbicas. Este producto comercial, está registrado con el nombre de Gaskit (Ferguson, Phillips y Willis, 1976)⁵⁵.

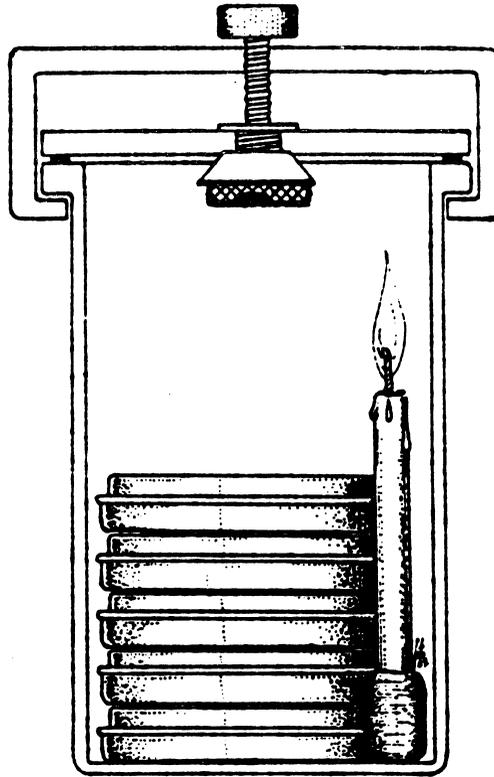


Fig. 2.44 Jarra de Brewer utilizando el método de velobiosis.

c. JARRA DE CRISTAL DE BREWER (Brewer y. Evans, 1938).

Otro método utilizado para obtener una atmósfera libre de oxígeno en la jarra de cristal de Brewer (además de utilizar el sistema Gaspak), consiste en encender una candela dentro del recipiente conteniendo las placas o tubos que van a incubarse un vez encendida la candela, se procede a cerrar la jarra inmediatamente, (Ver Fig. 2.44), esta técnica, puede ser aplicada también, en las campanas de anaerobiosis (técnica de velobiosis), las cuales son vasijas de cristal resistent

te (constituidas de una base y su tapa), estas campanas tienen gran aceptación, por ser económicas y de fácil utilización, sobre todo en los laboratorios donde no se cuenta con un sistema anaeróbico más sofisticado.

La campana de anaerobiosis, requerirá de un "sellado" el cual se realiza aplicando una cantidad determinada de vaselina sólida entre la base y la tapa.

La llama arderá hasta que el nivel de oxígeno descienda por debajo del necesario para una combustión continua cuando la llama se extingue hay en la atmósfera --- aproximadamente un 7% de CO_2 . Este es un método algo imperfecto y se recomienda únicamente cuando no se dispone de una técnica de aislamiento más adecuado^{5, 54}. (Ver Fig. 2.45).

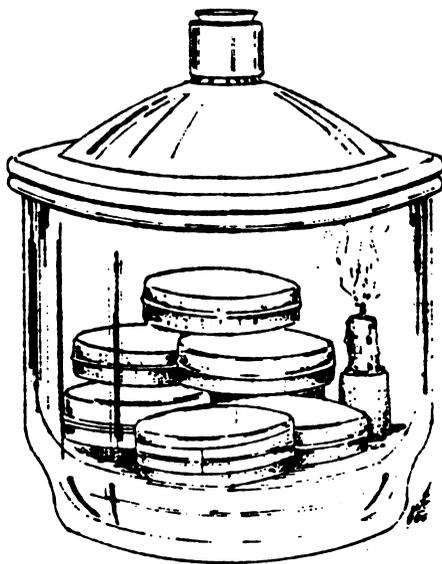


Fig. 2.45 Método de Velobiosis utilizando la campana de anaerobiosis.

4.2 INCUBADORES ANAEROBICOS

Actualmente, la sustitución del aire por un gas inerte es un método ampliamente utilizado y que ofrece ventajas. Las placas y los tubos de agar que van a ser incubados se colocan en una estufa incubador anaeróbico (Ver Fig. 2.46). El aire contenido en la estufa, es eliminado por evacuación, cuando se introduce en su lugar anhídrido carbónico, hidrógeno o nitrógeno, contenido en cilindros⁵⁴.

Las cajas anaeróbicas y las cajas enguantadas, constituyen otros métodos más sofisticados, que permiten el cultivo de anaerobios en ausencia total de oxígeno. Estos gabinetes unicamente son empleados por un número reducido de laboratorios, y en aquellas instituciones dedicadas a la investigación⁵⁵.

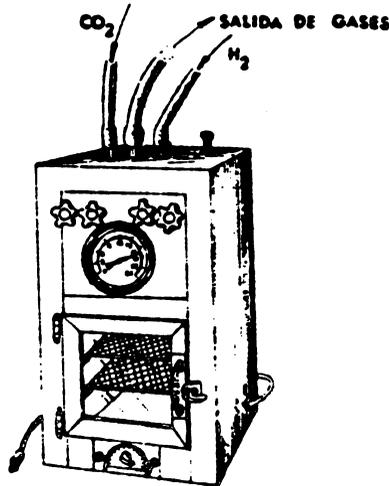


Fig. 2.46 Estufa incubador anaeróbico.

4.3 OTROS METODOS UTILIZADOS PARA OBTENER UNA ATMOSFERA LIBRE DE OXIGENO.

Para el estudio y aislamiento de rutina de los microorganismos anaerobios provenientes de material clínico, el método más conveniente es la utilización de jarras o incubadores anaeróbicos; sin embargo, existen otras técnicas sencillas pero efectivas, que pueden ser empleadas para el aislamiento cuando no se cuenta con el material adecuado. Algunas de las técnicas que más uso tienen en los laboratorios bacteriológicos son descritas a continuación:

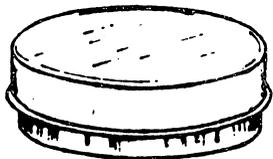
a. UTILIZACION DE ORGANISMOS AEROBIOS QUE ABSORVEN EL OXIGENO

El uso de microorganismos aerobios que consumen el oxígeno atmosférico, fue descrito originalmente por Fortner (1928). Los microorganismos más utilizados son los bacilos coliformes, Pseudomona aeruginosa y Bacillus subtilis.

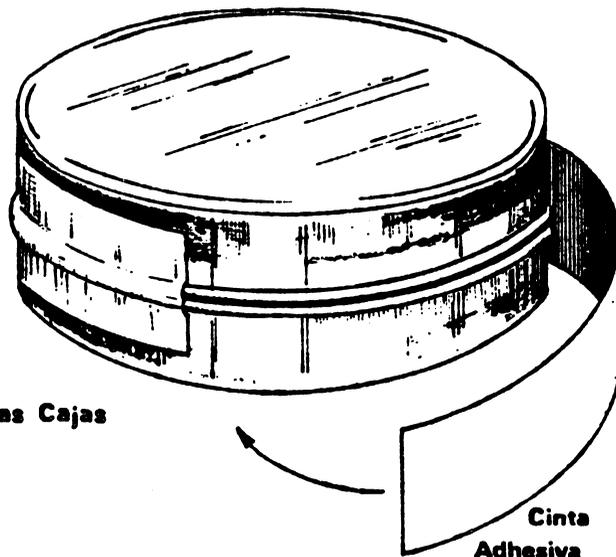
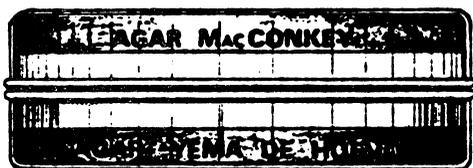
La técnica puede realizarse utilizando dos placas de agar sangre (aunque pueden emplearse, para algunos géneros como los Clostridios, una placa de agar yema de huevo y la otra de algún medio selectivo como el agar de Mac-Conkey), una de las placas se inocula con un organismo aerobio, y la otra se inocula con el organismo anaerobio a prueba. Las dos placas se juntan por los bordes, y la unión se sella utilizando cinta adhesiva (Ver Fig. 2.47). La preparación se incuba inmediatamente a 37° C.

Utilizando este método, debe tenerse en cuenta que la condición de anaerobios toma algún tiempo para desarrollarse, y que pueden ocurrir fallas, sobre todo, cuando tratamos con microorganismos muy exigentes⁵⁵.

AGAR MacCONKEY



AGAR YEMA DE HUEVO



Sellado de las Cajas

Fig. 2.47 Preparación del sistema de doble caja para el aislamiento de anaerobios.

b. EL METODO DEL PIROGALOL ALCALINO PARA CULTIVO SIMPLE

El método del pirogalol alcalino (Lockhart, 1953) es muy utilizado para el cultivo de anaerobios en tubos de ensayo. La condición de anaerobiosis, está proporcionada mediante el uso de carbonato sódico y pirogalol, este método es especialmente satisfactorio para el cultivo de Actynomices sp. anaerobios, ya que deja el residuo deseado de anhídrido carbónico. La técnica que describen Ajello y col., es la siguiente: 16, 55

PROCEDIMIENTO

- Al tubo inoculado con el microorganismo a prueba se le coloca una torunda de algodón.
- Se corta la parte del tapón de algodón no absorbente que sobresale del tubo.
- Mediante un movimiento de rotación, empujar el resto del tapón dejando un espacio de 2 a 2.5 cm en el extremo superior del tubo.
- Introducir un taquito de algodón absorbente en este espacio.
- Añadir 5 gotas de cada una de las soluciones de pirogalol (100 g de pirogalol (ácido pirogálico) + 150 ml de agua) y de solución al 10% de Na_2CO_3 .
- Cerrar herméticamente con tapón de goma e invertir el tubo. Se incuba en esta posición (Ver Fig. 2.48).

El pirogalol es oxidado a una serie de compuestos cuando se introduce el álcali, utilizando así el oxígeno libre. Si se utiliza este método, debe tenerse en cuenta que el ácido pirogálico es tóxico y se debe tener mucho cuidado al manejarlo. El CO_2 producido por la oxidación, puede inhibir el desarrollo de algunos microorganismos vegetativos⁵⁴.

El uso del pirogalol para el cultivo de anaerobios a sufrido varias modificaciones (Pankhurst, 1971; Sacks, 1974; Karnachow, 1961), donde fue utilizado en las jarras anaeróbicas, o bien incluido en placas de agar, preparadas de manera similar a la técnica de doble caja⁵⁵.

c. INOCULACION DE UN MEDIO SOLIDO POR PICADURA

Otro método simple pero de valor significativo, consiste en inocular un tubo con

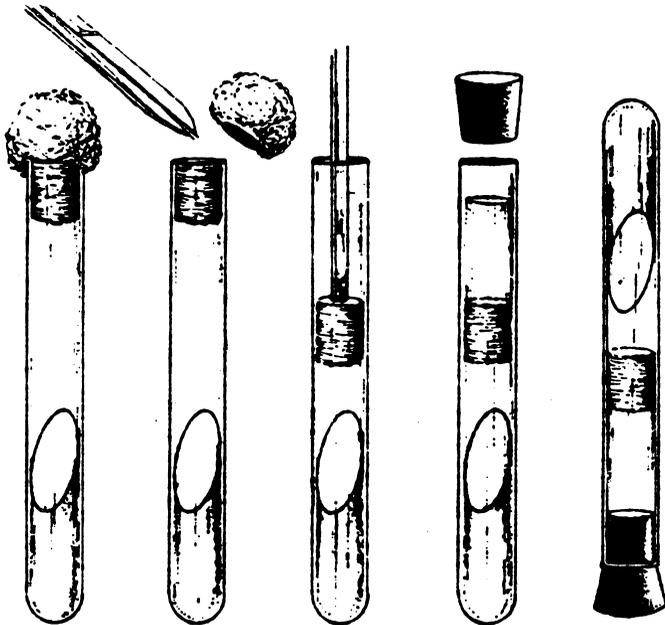


Fig. 2.48 Método del pirogalol alcalino para el cultivo de anaerobios en tubo de ensayo.

medio sólido profundo, este medio se inocula por picadura utilizando un alambre recto y tiene la ventaja de que en condiciones adecuadas ofrece un ambiente anaerobio en el espesor del agar, el cual permite el crecimiento de ciertos microorganismos que no pueden crecer o lo hacen difícilmente en presencia de oxígeno⁵⁶ (Ver Fig. 2.49).

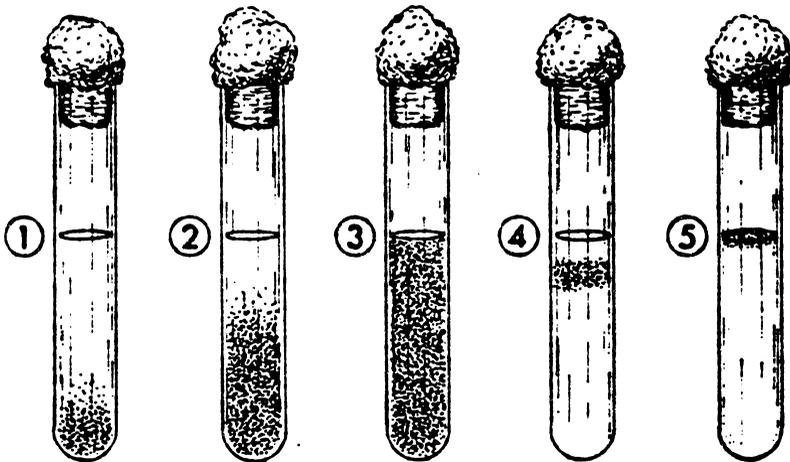


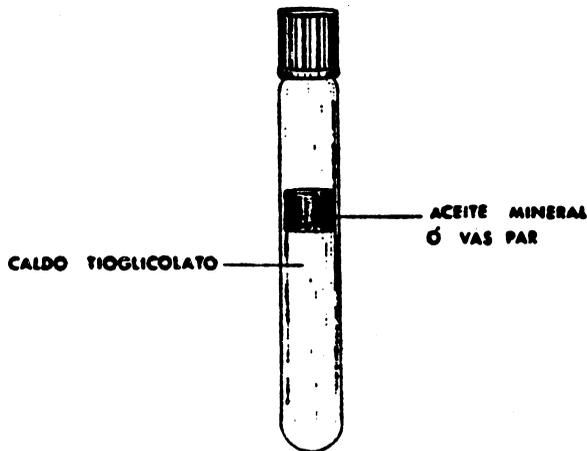
Fig. 2.49 Tubos con capa profunda de agar inoculados con bacterias con diversas reacciones al oxígeno. 1) bastante anaerobio, como el Cl. botulinum; 2) menos anaerobio, como el Cl. perfringens; 3) anaerobio facultativo, como E. coli; 4) microaerofílico, como Br. abortus; 5) aerobio estricto, como Pseudomona fluorescens.

4. UTILIZACIÓN DE MEDIOS PRAS (Hungate, 1966-1969)

El uso de los medios PRAS (Pre-reduced anaerobically sterilized), fue introducido por Hungate 1960 para el aislamiento de bacterias muy exigentes presentes en el líquido ruminal. Este método ha sufrido varias modificaciones e improvisaciones, que lo han hecho muy adaptable, sobre todo, para los estudios de carbohidratos 9, 40, 55.

Los medios comerciales, sólidos o líquidos, son esterilizados anaeróbicamente, y presentan una capa de aceite mineral sobre el medio (ejemplo, el medio de Carry y Blair). (Ver Fig. 2.50). Estos medios son de uso común en los laboratorios dedicados a la investigación, para llevar a cabo la técnica del tubo de rollo --- (roll-tube), utilizando las cajas enguantadas⁵⁵.

Fig. 2.50 Preparación de un medio PRAS.



En los laboratorios bacteriológicos, podemos implementar estos medios de cultivo cuando se requiera un aislamiento en medio líquido (en caldo tioglicolato o en el medio de Robertson), mediante la expulsión del oxígeno gaseoso hirviendo éste y -seguidamente impidiendo que vuelva a penetrar, utilizando una barrera relativamente compacta, como una capa de aceite mineral o de Vaspar (mezcla a partes iguales de vaselina y aceite de parafina) estéril. Es importante hervir el medio durante 10 minutos, enfriarlo rápidamente a 40-50°C e inocularlo masivamente (una gota o varias asas de cultivo) sin agitarlo. Inmediatamente de la inoculación debe sellarse el tubo⁵⁴.

e. INOCULACION EN EL MEDIO DE ROBERTSON

El medio de carne cocida (Cooked Meat Medium) fue introducido por Robertson (1915 1916), y se utiliza extensamente para el cultivo de la mayoría de los anaerobios⁵⁵.

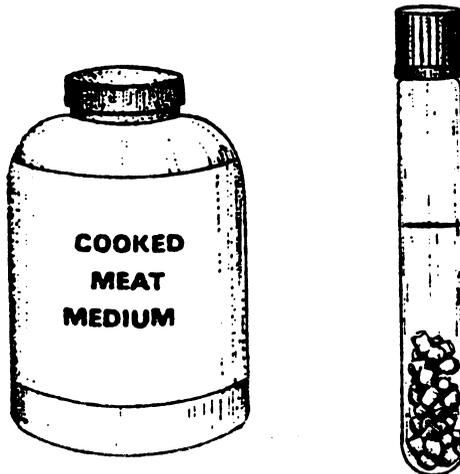
El medio de carne cocida puede ser preparado con partículas de carne de aproximadamente 2.5 cm., cubierta por 10 ml. de caldo nutritivo; la esterilización de este medio es difícil debido a la pobre conductividad de la carne, por lo que se recomienda, cocer la carne a 121° C durante 20 a 30 minutos³³.

Las sustancias reductoras presentes en el medio, principalmente la glutatona, -permiten el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos como el Cl. teta-
ni. El medio provee de una gran variedad de nutrientes para llenar todos los requisitos metabólicos de estos microorganismos⁵⁵.

Las condiciones de anaerobiosis que guarda este medio (reducción), está indicada por una coloración rosa, presente en la capa del tubo o frasco.

Un desarrollo comercial reciente, lo constituye la sustitución por partículas de carne congeladas y deshidratadas en forma acelerada (Ver Fig. 2.51), las cuales liberan factores esenciales para el desarrollo en el medio después de ser rehidratadas. Se agrega en forma adicional cisteína y almidón para reducir el potencial de óxido-reducción estándar y aumentar la recuperación de los microorganismos dañados³³.

Fig. 2.51 Medio de carne cocida de Robertson.



E. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La quimioterapia, es decir, la destrucción de los microorganismos por medio de -- los fármacos, se inició con los estudios pioneros de Ehrlich, que culminario con la obtención del Salvarsán para el tratamiento de la sífilis. En 1935 fueron introducidas las Sulfonamidas, después del trabajo de Domagk sobre el uso del Protonosil, cuyo principio activo es la Sulfanilamida, en las infecciones estreptocócicas en ratones. Desde entonces se han sintetizado docenas de nuevas Sulfamidas con actividad antibacteriana cada vez mayor y con una menor toxicidad¹⁹.

El término "antibióticos" se refiere a substancias elaboradas por microorganismos vivos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Actualmente no existe una diferencia neta entre los términos "antibióticos y --- "agentes quimioterapéuticos" pues algunos de los antibióticos que inicialmente se aislaron a partir de fuentes naturales se han preparado también sintéticamente, - un ejemplo notable de ello es el cloranfenicol.

La tendencia de muchas bacterias a hacerse resistentes a los antibióticos ha venido a constituir un problema cada vez mayor, muchas cepas de microorganismos tradicionalmente considerados hace algunos años como sensibles a ciertos antibióticos son ahora resistentes, principalmente debido a la amplia distribución de plásmidos responsables de resistencia múltiple infecciosa a drogas quimioterapéuticas. Esto parece indicar que el uso inadecuado de los antibióticos puede conducir a graves consecuencias y subraya, por tanto, la importancia de elegir el antibiótico conveniente con ayuda de pruebas de susceptibilidad in vitro^{19, 40}.

Varios factores influyen en la elección del antimicrobiano más apropiado para la quimioterapia de una infección bacteriana.

- Susceptibilidad inherente del agente etiológico a los antimicrobianos apropiados in vitro.
- Relación de la susceptibilidad de la cepa bacteriana en cuestión con aquella de otros miembros de la misma especie.
- Farmacocinética del antimicrobiano, incluyendo su toxicidad, su unión con proteínas en el organismo, su distribución, absorción y excreción, especialmente en presencia de daño hepático y/o renal.
- Experiencia clínica previa sobre la eficacia del tratamiento de infecciones -- por la misma especie del microorganismo.
- Naturaleza del proceso patológico y el estado inmune del organismo.

Tanto la susceptibilidad inherente del microorganismo a los antimicrobianos in vitro, como los niveles alcanzados por estos, en los líquidos tisulares, pueden ser medidos en el laboratorio clínico⁴⁰.

La mayoría de las pruebas de sensibilidad son relativamente sencillas en su aplicación, principalmente por métodos de difusión en medios de cultivo de gelosa sólida. Estos métodos son de alta exactitud, si se hacen correctamente, y si se conserva en mente que la razón para hacerlos consiste en el diseño del tratamiento clínico¹².

1. METODO DE DIFUSION EN GELOSA

El método más común aplicado universalmente es el disco. Este fue recomendado en 1961 por el W. H. O. (Expert Committee on Antibiotics), quienes lo hallaron como el más adecuado para trabajos sistemáticos.

Discos o tiras de papel impregnados con cantidades conocidas de antibióticos se -

colocan en la superficie de cajas de Petri sembradas con los microorganismos que han de examinarse. La susceptibilidad queda indicada por una zona de inhibición del crecimiento alrededor del papel impregnado con el fármaco⁵⁴.

Con los métodos de difusión en agar, el microorganismo a prueba se expone sobre un medio de cultivo nutritivo, tal como gelosa sangre, a un gradiente de difusión del antibiótico proporcionado por un disco.

La difusión es influida por muchos factores. Cooper, Linton y Sehgal (1958) y Linton (1958), han estudiado a fondo este tema. El contenido y el grosor del medio, sangre, concentración iónica, el pH, la magnitud del inóculo, todos pueden afectar la zona de inhibición. Lo más importante es el grado de difusión del antibiótico contra la velocidad de desarrollo bacteriano¹².

2. METODO DE DILUCIONES DE LA PLACA DE AGAR

Placas de agar que contengan cantidades conocidas de antibiótico se siembran con los microorganismos que han de examinarse, y se observa la inhibición del crecimiento.

Este método, en contraste con el del disco, es cuantitativo, es particularmente adecuado para la N. gonorrhoeae y N. meningitidis, pero no puede utilizarse en organismos que tienden a extenderse en el medio, como el Proteus y Pseudomona. Es similar al de la dilución en tubos, la única diferencia es que las diluciones de los antibióticos se hacen en gelosa fundida a 56° C y que se extiende en cajas de Petri¹².

3. METODOS DE DILUCIONES EN TUBOS DE ENSAYO

Se inoculan varios tubos que contengan un vehículo nutritivo y diluciones séricas del antibiótico, con suspensiones del microorganismo problema. La determinación de la susceptibilidad al fármaco queda manifiesta por la incapacidad del microorganismo de crecer a una dilución determinada¹⁹.

Las pruebas de dilución (en agar o tubo) de los antimicrobianos proporcionan un dato muy valioso para el clínico: la concentración mínima inhibitoria o M. I. C. (Minimal Inhibitory Concentration) para un determinado microorganismo. Este parámetro nos permite establecer una relación con los niveles alcanzados por la droga en los líquidos tisulares, especialmente en la sangre, para así contar con mayores probabilidades de escoger un antibiótico adecuado⁴⁰.

Con el método de las diluciones en tubos pueden surgir graves errores si no se tienen en cuenta los siguientes factores y no se controlan de manera adecuada: el tamaño del inóculo, la solubilidad y la estabilidad del antibiótico que ha de examinarse, la composición del medio de cultivo empleado y las necesidades de los microorganismos en estudio para que se desarrollen¹⁹.

4. OTROS PROCEDIMIENTOS

La susceptibilidad a los antimicrobianos, puede también demostrarse por cambios físicos o químicos durante el crecimiento bacteriano, tales como un cambio en el pH, reducción de la hemoglobina, inhibición de la hemólisis y el uso de indicadores para la detección de las reacciones de óxido - reducción¹⁹.

Lo más importante en todas las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, in-

dependientemente del método que se emplee, es asegurarse de que éste último, sea exacto y reproducible, de que todas las operaciones se realicen correctamente y con controles adecuados, y de que los resultados se anoten de la manera debida.

5. TECNICAS EMPLEADAS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

5.1 METODOS DE DIFUSION DEL DISCO

Los intentos realizados a lo largo de los últimos años por la Food an Drug Administration y otros centros para estandarizar los métodos de difusión en gelosa, ha culminado con el desarrollo de un conocimiento basado en el decrito por Bauer, Kirby y cols. (1966). Este procedimiento representa en la actualidad el método mejor descrito, dicho procedimiento conjuntamente con los rígidos controles de los discos antibióticos y los controles de calidad entre laboratorios, ha resultado de gran importancia en el establecimiento de una técnica de sensibilidad adecuada¹⁹.

NOTA: Con el objeto de simplificar las pruebas de susceptibilidad, es necesario limitar el número de agentes que se prueban más comunmente. En general, las pruebas habituales deberfan incluir sólo un representante de cada grupo de agentes antimicrobianos con actividad in vitro estrechamente relacionada.

Generalmente los fabricantes suministran los cartuchos que contienen discos para la prueba de susceptibilidad en recipientes separados que contienen un agente desecante. Estos recipientes deben mantenerse refrigerados por debajo de los 8° C o congelados (-14° C) hasta su utilización¹⁹.

a. MEDIO UTILIZADO PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN DISCO

El agar de Mueller - Hinton (pH: 7.4), es un medio muy rico en nutrientes que se recomienda para realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiograma). También se emplea, sobre todo, para el aislamiento y desarrollo de Gonococos y Meningococos.

FORMULA:

Infusión de carne de res	300.0 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
Agua destilada	1000.0 ml.

NOTA: Cuando la prueba requiere ser montada sobre una placa de agar sangre o chocolate, es necesario adicionar sangre de carnero, bovino o humano a razón de 5%. La base de agar Mueller-Hinton deberá estar a un fluido, a una temperatura de 45 - 50° C para el caso de agar sangre, y a 80 - 90°C en la preparación de agar chocolate⁸.

b. METODO DE LA SUPERPOSICION EN AGAR (Barry y cols. 1970)

Esta técnica resulta aplicable sólo para bacterias de rápido crecimiento y no puede utilizarse en los casos en que es preciso añadir sangre al medio de prueba¹⁹.

PROCEDIMIENTO

- Seleccionar de 5 a 10 colonias cultivadas durante 18 horas. Preparar una suspensión turbida uniforme en 0.5 ml de caldo de infusión cerebro y corazón.
- Incubar el caldo de cultivo a 37° C durante 4 a 8 horas.

- Transferir una porción calibrada de 0.001 ml del caldo de cultivo bien mezclado a 9 ml de una solución acuosa estéril al 1.5% de agar (en tubos con tapón de rosca) fundido y mantenido a 50° C.
- Mezclar rápidamente este agar inoculado mediante una inversión cuidadosa y a continuación extenderlo sobre la superficie de una caja de Petri de 150 x 15 mm que contenga agar de Mueller - Hinton en 4 mm de profundidad. (Si se utilizan cajas de 90 mm, sembrar 4 ml de agar con un asa de 0.01 ml).
- Dejar descansar sobre una superficie lisa las cajas inoculadas durante 3 a 5 min. y a continuación aplicar los discos antimicrobianos de alta concentración presionando suavemente sobre cada uno de ellos con pinzas estériles a fin de asegurar un buen contacto con el agar.

En este método se pueden aplicar hasta 11 discos en estas condiciones en una caja de 15 cm de diámetro, y 6 discos cuando utilizamos cajas de 10 cm. (Ver Fig. 2. 52). Es de importancia recordar que sólo deberán emplearse concentraciones de -- antibióticos comparables con las cifras terapéuticas generales.

- Invertir las cajas e incubarlas a 37° C. Los pasos 3 a 6 deben completarse en un período de 30 minutos.
- Después de las 16 a 18 horas de incubación, medir los diámetros de las zonas de inhibición total ¹² (Ver Fig. 2.53).

Los "Multidisc" también se pueden probar por este método y se consideran para todo caso o propósito como método de un sólo disco (Ver Fig. 2.54). Es importante juzgar por separado la zona de inhibición de cada antibiótico y no compararlos -- entre sí, los resultados se describen al igual que en la prueba de disco simple de Bauer - Kirby (Ver cuadro 2.24) ¹².

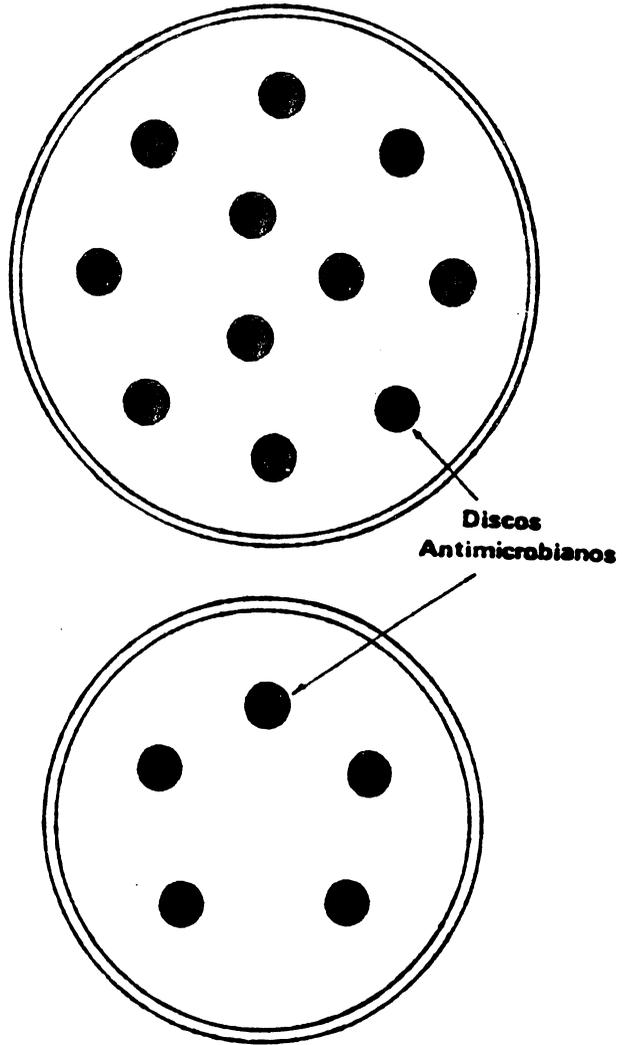
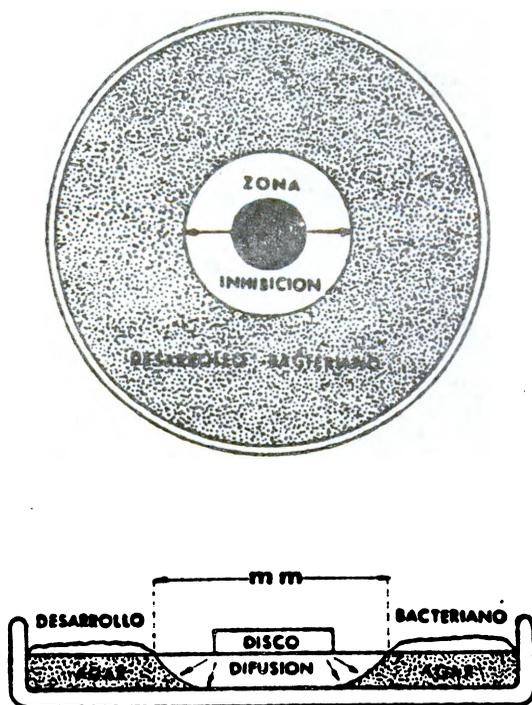


Fig. 2.52 Distribución de los discos impregnados con anti-
bióticos en el agar de Mueller - Hinton.

Fig. 2.53 Técnica de difusión del disco en agar mostrando la zona de inhibición.



RESULTADOS

Después de la incubación, se examinan macroscópicamente las áreas de inhibición - o se miden con calibradores Bernier y el grado de sensibilidad se determina sólo por medio visual o con gráficas de la zona de inhibición.

c. METODO DE BAUER - KIRBY (Bauer - Kirby y cols. 1966)

Es una prueba de difusión en gel referida como cualitativa que sin embargo, se - puede considerar como cuantitativa dado que los diámetros de inhibición se rela-

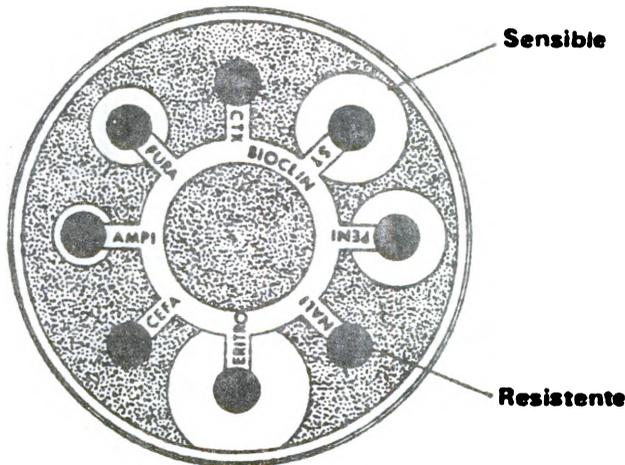


Fig. 2.54 Multidisco montado sobre una placa de gelosa.

cionan directamente con las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por - pruebas de dilución en tubo de ensayo^{31, 32}.

El método de Bauer - Kirby - Turck, es una prueba normativa de sensibilidad con - disco único, para patógenos de rápido desarrollo¹².

requisitos mínimos de equipo, tiempo, técnicas de laboratorio, espacio, etc.

de ser el único método de diagnóstico probable, como en el caso de que el organismo problema no pueda ser cultivado in vitro (Mycobacterium leprae) características de cultivo especiales.

puede orientar tentativamente a un diagnóstico y tratamiento rápidos.
puede dar una idea de la cantidad de gérmenes relacionados en el proceso (forma, tamaño y disposición).
muestra sus características de tinción.

ventajas:

requiere la presencia de grandes cantidades de microorganismos para la obtención de resultados positivos.

que aproximadamente por cada bacteria que se observa al microscopio de inmersión existen 10^6 bacterias por ml o gramo de muestra.
la mayoría de los casos no proporciona respuesta de la acción de toxinas, etc., relacionados con el proceso in vitro. Respuesta más exacta se puede obtener con el uso de anticuerpos marcados (fluoresceína, ferritin, etc.) o utilizando microscopía de campo oscuro.

CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS BACTERIAS

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas, pero, el desarrollo de la Microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas, desarrolladas en medios desprovistos de organismos con-

secuencia. En consecuencia, las bacterias se clasifican dentro de los siguientes grupos:
a) las cuales, cuando están totalmente desarrollados libres, son perfectamen-

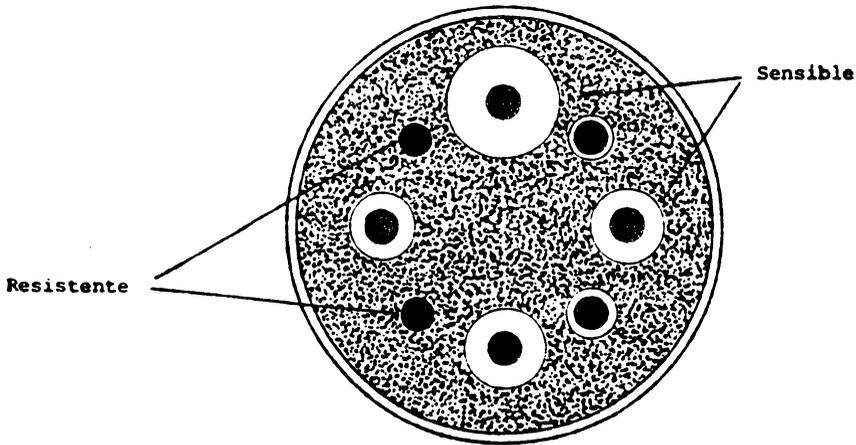


Fig. 2.55 Discos antimicrobianos distribuidos en el agar de Mueller - Hinton.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

- Medir los diámetros de inhibición utilizando un compás, una regla o un Bernier. Si es preciso, los diámetros de las zonas pueden leerse después de la incubación al cabo de 6 a 8 horas, siempre que hayan aparecido áreas definidas de inhibición.
- Se acepta como punto final el área que no muestra crecimiento visible, detectable a simple vista (Ver Fig. 2.55). Los tamaños de las zonas de inhibición se interpretan a continuación, y en el cuadro 2.24^{12, 19}.

Cuadro 2.24

Esquema de interpretación de la zona de inhibición para las pruebas de difusión en gelosa

Agente antimicrobiano	Potencia del disco	Diámetro de la zona de inhibición (Resultados redondeados en mm)			
		Resistente	Intermedio	Susceptible	
Ampicilina	Gramnegativos y enterococos	10	11 o menos	12-13	14 o más
	Estafilococos y organismos sensibles a la penicilina		20 o menos	21-28	29 o más
	Otros organismos		11 o menos	12-21	22 o más
Bacitracina	10 U	8 o menos	9-12	13 o más	
Carbenicilina	50 µg	Pseudomonas sp	12 o menos	13-14	15 o más
		E. Coli y Proteus	17 o menos	18-22	23 o más
Cerularicina	30 µg	11 o menos	12-15	16 o más	
Cefalotina	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más	
Cloramfenicol	30 µg	12 o menos	13-17	18 o más	
Clindamicina	2 µg	11 o menos	12-15	16 o más	
Colistina	10 µg	8 o menos	9-10	11 o más	
Eritromicina	15 µg	13 o menos	14-17	18 o más	
Gentamicina	10 µg	12 o menos	13-14	15 o más	
Kanamicina	30 µg	13 o menos	14-17	18 o más	
Lincomicina	2 µg	9 o menos	10-14	15 o más	
Metilicina	5 µg	9 o menos	10-13	14 o más	
Nafcilina y Oxacilina	1 µg	10 o menos	11-12	13 o más	
Acido nalidixico ¹	30 µg	13 o menos	14-18	19 o más	
Neomicina	30 µg	12 o menos	13-16	17 o más	
Nitrofurantoina ¹	300 µg	14 o menos	15-18	19 o más	
Novobiocina ²	30 µg	17 o menos	18-21	22 o más	
Oleandomicina	15 µg	11 o menos	12-16	17 o más	
Estafilococos	10 U	20 o menos	21-28	29 o más	
Penicilina G	Otros organismos ³		11 o menos	12-21	22 o más
Polimixina B	300 µg	10 o menos	11-14	15 o más	
Estreptomicina	10 µg	11 o menos	12-14	15 o más	
Sulfamidas ^{1, 4}	300 µg	12 o menos	13-16	17 o más	
Tetraciclina	30 µg	14 o menos	15-18	19 o más	
Vancomicina	30 µg	9 o menos	10-11	12 o más	

Preparado por el National Committee for Clinical Laboratory, Los Angeles Calif., Junio, 1971.

1° Infecciones del conducto urinario

2° No aplicable a medios que contengan sangre, 3 Esta categoría incluye algunos organismos, tales como los enterococos, que pueden causar infecciones sistémicas tratables mediante altas dosis de penicilina G. 4 Cualquiera de los discos de 250 a 300 mg. de sulfamida, comercialmente disponibles, puede utilizarse con los mismos estándares de interpretación de zona.

5.2 METODO DE DILUCION EN TUBO DE ENSAYO

El método requiere utilizar soluciones antimicrobianas originales; pueden obtenerse en el mercado o de diversos fabricantes farmacéuticos partidas de fármacos cristalinos de potencia conocida.

PROCEDIMIENTO

- Preparar las soluciones originales que contengan 1.000 g. o U/ml en agua destilada estéril. Solubilizar con los disolventes apropiados o bien ajustando el pH, si es necesario. Si es preciso, esterilizar también mediante filtración a través de una membrana, estas soluciones pueden congelarse a -20° C en recipientes individuales herméticamente cerrados de 6 a 8 semanas sin pérdida de su potencia.
- Para cada uno de los agentes que han de ensayarse, preparar en una gradilla una serie de 10 tubos de ensayo estériles, añadir a cada uno de los últimos 9 tubos de la serie 0.5 ml de caldo de cultivo. Puede utilizarse para ello soya con tripticasa, tioglicolato o caldo de infusión enriquecido con fluido ascítico o sangre de conejo, según los requisitos de crecimiento del organismo que se desea ensayar.
- Añadir a continuación 0.5 ml de la solución de trabajo del antibiótico, generalmente 100 U/ml, a los dos primeros tubos, mezclar, transferir 0.5 ml del tubo 2 al tubo siguiente y continuar este proceso hasta llegar al tubo número 9, del cual se desechan 0.5 ml. El tubo número 10 actúa como control del cultivo.

- Preparar una solución 1:1000 en un caldo, de un cultivo incubado por 18 horas del organismo que ha de probarse. En los casos de organismos de crecimiento lento o delicados, debe utilizarse una dilución de 1:100. Añadir 0.5 ml de esta solución a cada uno de los tubos de la serie y agitar, incubar la preparación durante 12 a 18 horas a 35 - 37° C (Ver cuadro 2.25).

RESULTADOS:

- Examinar macroscópicamente los tubos. La concentración mínima inhibitoria --- (M. I. C.) es la dilución máxima del antibiótico en el último tubo que no muestra crecimiento visible y se expresa en unidades o microgramos por mililitro.

Para determinar la concentración bactericida mínima, cada uno de los tubos claros se subcultiva en un medio adecuado en cajas de agar.

Esta técnica debe modificarse para agentes como las sulfamidas, ácido nalidíxico y nitrofurantoina (Blair, 1970; Ericson y Sherris, 1971)¹⁹.

Cuadro 2.25
Método de dilución del tubo de ensayo

No. de tubo	Caldo añadido (ml)	Agente antimicrobiano (ml)	Inóculo de Cultivo (ml)	Concentrado antimicrobiano (U o Mg).
1	0	0,5	0,5	100
2	0,5	0,5	0,5	50
3	0,5	0,5 del tubo 2	0,5	25
4	0,5	0,5 del tubo 3	0,5	12,5
5	0,5	0,5 del tubo 4	0,5	6,25
6	0,5	0,5 del tubo 5	0,5	3,12
7	0,5	0,5 del tubo 6	0,5	1,56
8	0,5	0,5 del tubo 7	0,5	0,78
9	0,5	0,5 del tubo 8 desechar 0,5	0,5	0,39
10	0,5	0	0,5	0

GLOSARIO EMPLEADO PARA LA DETERMINACION DE SENSIBILIDAD

SENSITIVA (S):

En infecciones no complicadas, se pueden esperar que el microorganismo infectante sea inhibido por concentraciones fácilmente obtenidas en la sangre con los esquemas usuales de dosificación.

RESISTENCIA (R):

El microorganismo infectante no es inhibido por la concentración del antibiótico obtenida en la sangre.

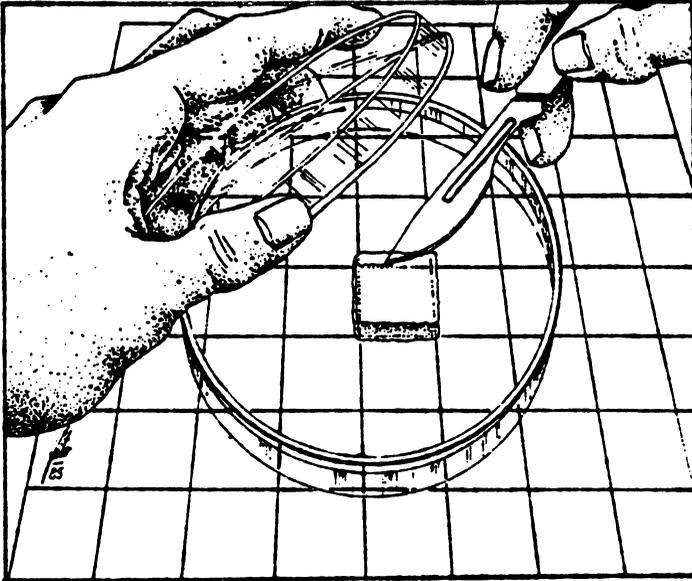
INTERMEDIA (I):

Se aplica cuando el microorganismo se encuentra entre sensible y resistente. En la conducción de tratamientos deben considerarse cuidadosamente la dosis y el sitio de la infección, junto con las posibles "C.I.M.S", in vitro, para poder calcular tanto el grado de sensibilidad como la dosis.

Este método no debe aplicarse para determinar sensibilidades a las sulfonamidas. Tampoco resulta aplicable para determinar la susceptibilidad de organismos de lento crecimiento que requieren CO₂ o de anaerobios también de lento crecimiento, como los Bacteroides, puesto que los resultados no pueden ser interpretados adecuadamente^{12, 19.}

CAPITULO III

MICOLOGIA



CAPITULO III

MICOLOGIA

Durante las dos últimas décadas se han acumulado rápidamente vastos conocimientos acerca de los hongos patógenos y de las enfermedades que producen; antes de este tiempo la Micología era una ciencia despreciada y poco comprendida en la mayor parte de los programas de enseñanza. Conforme las micosis se fueron descubriendo con mayor frecuencia y fue puesta de manifiesto su importancia, la Micología ha sido ya reconocida como una especialidad médica³⁶.

El objetivo de esta sección es el de proporcionar una idea básica y general de los conocimientos y criterios actuales que existen para el diagnóstico de las enfermedades producidas por hongos que afectan a los animales. No obstante de existir en México la gran mayoría de hongos capaces de afectar a los animales de importancia en Medicina Veterinaria, su estudio requiere de mayor investigación, trabajo y paciencia por parte del Médico Veterinario.

Los métodos empleados para el estudio de los hongos microscópicos, incluyen para su desarrollo algunos medios y técnicas, (sembrado, tinción, etc.), semejantes a las utilizadas para Bacteriología. Sin embargo, las técnicas descritas en esta sección permiten identificar, aislar y teñir de manera específica a la mayoría de los hongos causantes de enfermedad en los animales domésticos²⁶.

A. MORFOLOGIA BASICA DE LOS HONGOS

¿Qué son los hongos?. Definir los límites exactos del grupo es virtualmente imposible, ya que cuanto más estudiamos los organismos vivos, tanto más resultan carentes de significado nuestras tentativas por delimitar cualquier grupo en particular. Los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos con núcleo, portadores de esporas, acrófilos, 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 o quitina, o ambas³.

Los hongos se manifiestan de muchas maneras. Sus propiedades biológicas se extienden hacia todos los campos. Los hay altamente infecciosos o venenosos, tanto para el hombre como para los animales; otros por el contrario, constituyen la base de una gran cantidad de procesos industriales de fermentación, tales como la elaboración del pan, vino, cerveza, y la preparación de algunos quesos; algunos tienen -- gran importancia en la producción comercial de muchos ácidos orgánicos y de algunas preparaciones vitamínicas, y son responsables de la elaboración de ciertas sustancias antimicrobianas o antifúngicas. Un cuarto grupo, en cambio, se caracteriza por dañar la materia orgánica (alimentos, tejidos, cuero y otros artículos). Por último unos pocos se emplean como alimento⁵⁷.

Los hongos constituyen un grupo de organismos vivos que tienen en sus células verdaderos núcleos típicos, que se reproducen por medio de esporas y que carecen de clorofila. No poseen tallos, raíces ni hojas, ni tienen un sistema vascular desarrollado como los tipos vegetales más evolucionados. Son unicelulares (levaduras), o pluricelulares (conocidos como hongos filamentosos), o carnosos (Ver Fig. 3.1).

Los filamentos que constituyen el cuerpo de un hongo se alargan por crecimiento --

apical (a partir de una estructura denominada tubo germinativo), pero la mayor -- parte del organismo es potencialmente capaz de crecimiento, y un pequeño fragmento de cualquier parte del hongo es suficiente para dar origen a un nuevo individuo²⁰ (Ver Fig. 3.2).

Las estructuras reproductoras están diferenciadas de las somáticas y exhiben una gran variedad de formas que son indispensables para su clasificación. Pocos hongos pueden ser identificados si no se dispone de sus estadios reproductores; con pocas excepciones, sus estructuras somáticas son muy similares entre sí³.

1. ESTRUCTURAS SOMATICAS

El talo de los hongos está formado típicamente por filamentos microscópicos cuyas ramas dispuestas en todas direcciones se extienden sobre o dentro del sustrato utilizado como alimento. Se denominan a cada uno de estos filamentos con el nombre de Hifa (hyphes=tejido, tela de araña). La hifa está constituida por una pared tubular delgada, transparente, interiormente llena o revestida por un estrato de protoplasma de espesor variable. Según la especie de que se trate, el protoplasma -

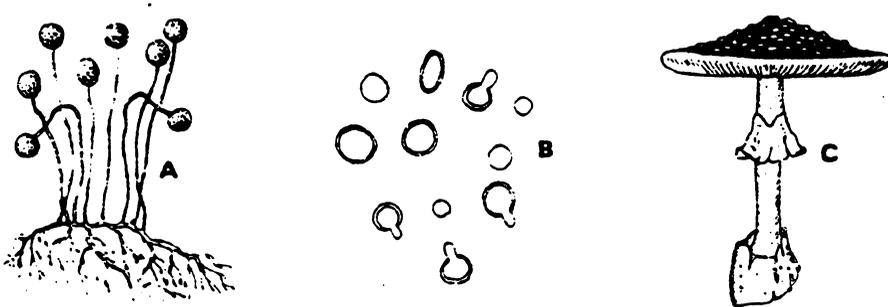


Fig. 3.1 Morfología general de los hongos: A) hongos miceliales; B) levaduras; C) hongos carnosos

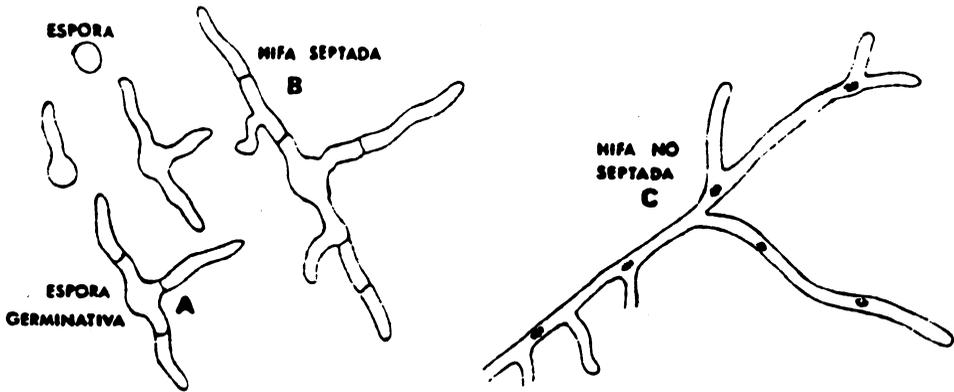


Fig. 3.2 Crecimiento apical a partir de una espora germinativa.

puede fluir libremente en el interior de la hifa o ser interrumpido a intervalos irregulares por tabiques o paredes transversales que dividen a las hifas en células. Las paredes transversales se denominan septos (seprum=cerco, partición), -- y las hifas que presentan ésta característica son conocidas como hifas septadas (Ver Fig. 3.2-B). En los hongos en cuyas hifas no hay septos (hifas --- aseptadas), los núcleos están incluidos en el citoplasma y distribuidos uniformemente en todo el protoplasma (Ver Fig. 3.2-C). Este estado se denomina cenocítico (coenos=vacío y citos=célula); mientras que en cada célula de las hifas septadas, los núcleos varían de uno a varios^{3, 20, 24}.

Al conjunto de hifas se le denomina Micelio. El micelio se diferencia de acuerdo a su estructura, función y localización (Ver Fig. 3.3). Cuando éste está constituido por una estructura laxa como la de los mohos, recibe el nombre de micelio prosenquimatoso; por el contrario, cuando el micelio es compacto como el de los

hongos carnosos, se denomina micelio presenquimatoso. El micelio aéreo, llamado también reproductor, es la porción proyectada que contiene la mayoría de las esporas y proporciona el material necesario para la identificación del hongo. El micelio vegetativo, es la porción que se adhiere al sustrato actuando como una raíz debido a que es a través de esta parte que el hongo se nutre^{9, 15} (Ver Fig. 3.3).

Los términos levadura y moho no pueden, en algunas ocasiones, aplicarse de una manera estricta. Algunos hongos patógenos del hombre y de los animales pueden adoptar características de Dimorfismo, de tal manera, que pueden presentar forma de mohos en su estado saprófito y transformarse en levaduras, cuando se localizan en los tejidos o cuando son incubados a 37° C en un medio de cultivo apropiado (ejemplo, Histoplasma capsulatum).

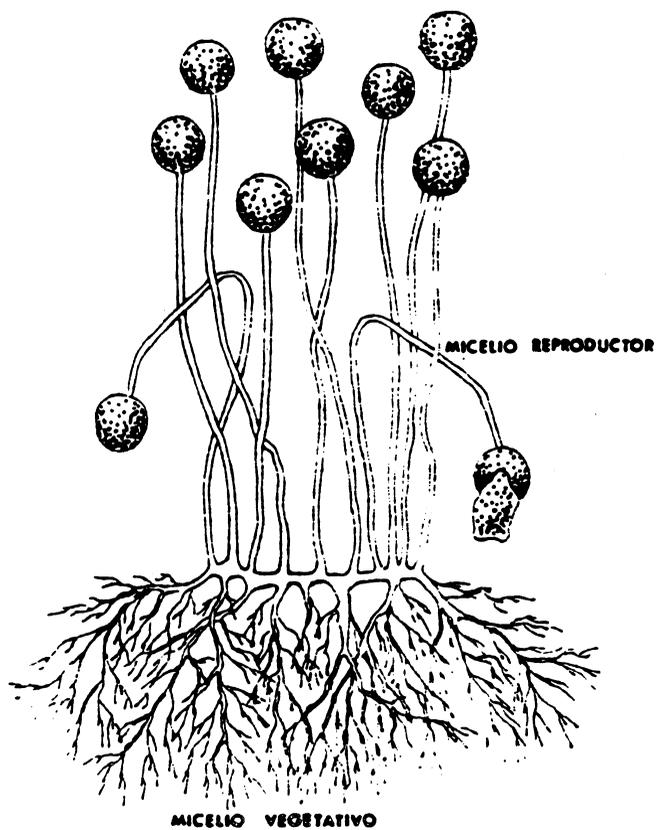
2. ESTRUCTURAS REPRODUCTORAS

Las estructuras encargadas de la reproducción de los hongos son denominadas esporas. Los tipos y formas esporulación son la forma más convincente para caracterizar a los hongos, un hongo que produce solamente esporas asexuales se clasifica como hongo imperfecto (en este grupo se incluyen la mayoría de los hongos patógenos); por el contrario, los hongos perfectos son aquellos que producen esporas sexuales y asexuales para su reproducción.

2.1 REPRODUCCION ASEJUAL

Se define la reproducción asexual como la producción no sexual de células reproductoras especializadas. Debemos incluir en esta definición, también, cualquier

Fig. 3.3 Ejemplo de un Hongo Micelial.



método de propagación que dé nuevos individuos; según este concepto, las formas de reproducción asexual que comúnmente se encuentran en los hongos son las siguientes: 1) Fragmentación del soma y crecimiento de un nuevo individuo a partir de cada fragmento. 2) Fisión de células somáticas en células hijas. 3) Gemación de células somáticas o esporas y producción de esporas cada una de las cuales, por lo común, formará un tubo germinal que iniciará un nuevo micelio³.

La forma más simple de las esporas asexuales la constituyen las Talosporas, las cuales se desarrollan directamente de la célula vegetativa. Las Blastosporas, las Clamidosporas y las Artrosporas son algunos ejemplos de la producción de Talosporas.

ARTROSPORAS (Ver Fig. 3.4-A). Son formadas de manera simple por la desarticulación del micelio al final de las hifas. Son de paredes gruesas, de tamaño y morfología variable, dependiendo de la especie. Son las estructuras de identificación "in vitro" de varios agentes patógenos importantes en Medicina Veterinaria y Salud Pública como en el caso de Coccidioides immitis⁹.

BLASTOPORAS (Ver Fig. 3.4-B). Se originan por gemación a partir de una yema, la partición ocurre por constricción de la pared de la célula madre. Esta es la forma común de reproducción vegetativa entre las levaduras. Algunos ejemplos de levaduras patógenas son: Candida spp., Cryptococcus neoformans, Blastomyces dermatitidis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenkii, etc.

CLAMIDOSPORAS (Ver Fig. 3.4-C). Son esporas asexuales de forma redonda, resistentes y de paredes gruesas. Se forman por la diferenciación directa del micelio y contienen en su interior una fracción de protoplasma y material nutriente. En --

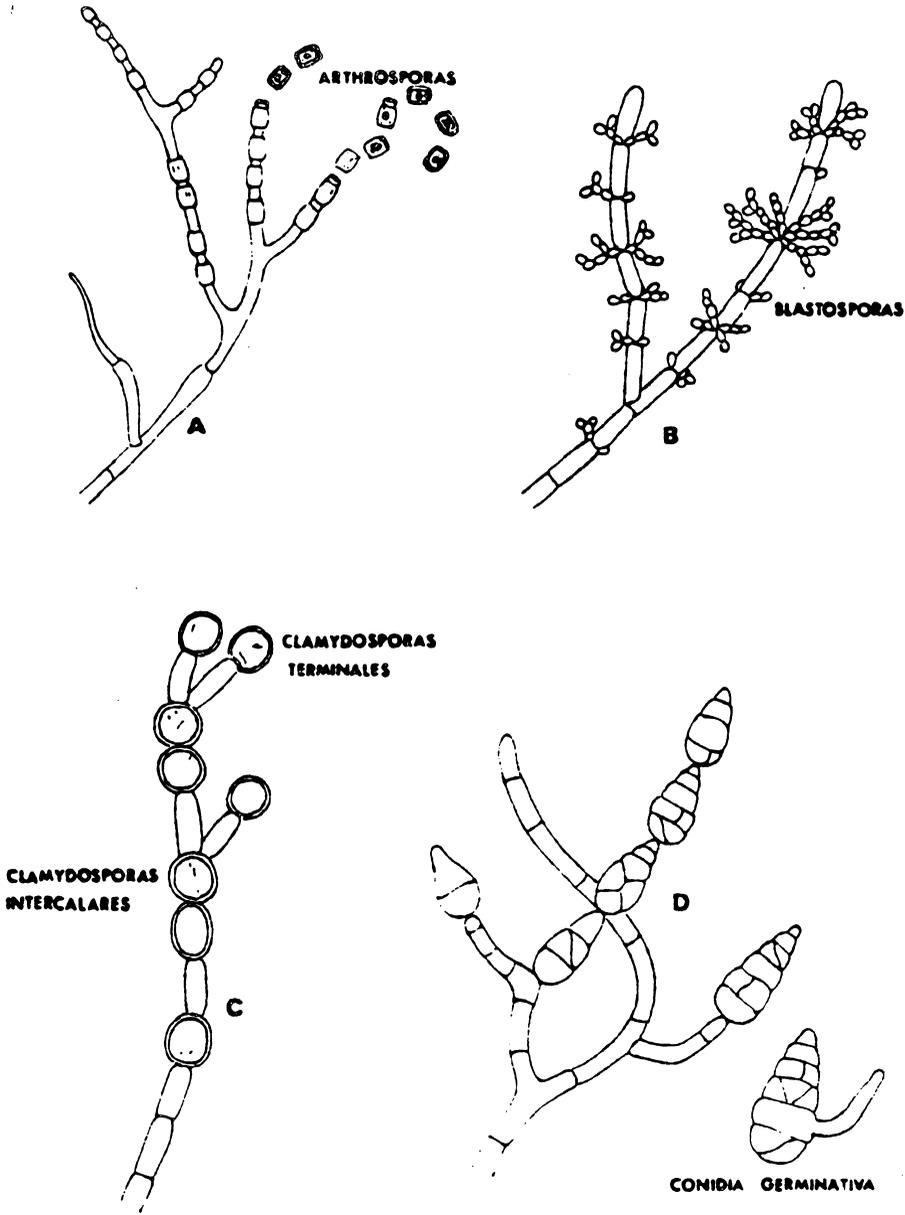


Fig. 3.4 Formación de Talosporas: A) Arthrosporas; B) Blastosporas; y C) Clamidosporas. D) conidios multicelulares.

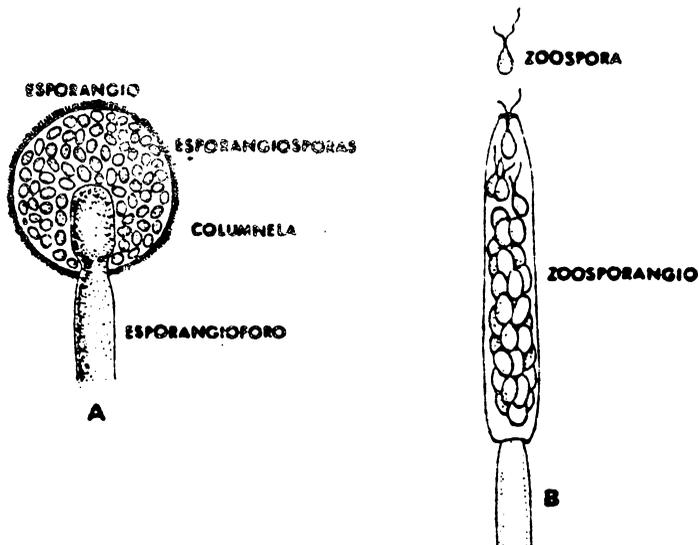


Fig. 3.5 Esporangioforos maduros: A) Esporangiosporas contenidas en el asca. B) Liberación de Zoosporas. Funder, 1968.

en realidad éstas no son estructuras reproductoras, sino formas de resistencia de la mayoría de los hongos a condiciones desfavorables. Su valor de diagnóstico es nulo, a excepción del hongo Trichophyton verrucosum, causante de la Tífa en bovinos⁴⁰.

Las esporas asexuales pueden ser producidas dentro de estructuras especializadas:

LAS ESPORANGIOSPORAS (Ver Fig. 3.5): se producen dentro de una estructura globosa formadora de esporas conocida como esporangio. Esta estructura se origina por una modificación de la hifa, el esporangioforo. Los hongos importantes que se caracterizan por este tipo de espóra son: Mucor, Rhizopus, y Absidia²⁴.

LAS CONIDIOSPORAS: Son esporas que se pueden comparar con las semillas de flores o de grandes plantas. Se pueden presentar en "estuches" o conidióforos, los cuales son una estructura modificada de la hifa (Ver Fig. 3.4-D) o bien, por medio de una célula "pie" o base de la hifa madre (Ver Fig. 3.6), los conidióforos terminan en un cuerpo frutal, el cual es característico de las especies en relación a su estructura y pigmentación, el cuerpo frutal consiste en una o varias conidiosporas creciendo de acuerdo a la especie de que se trate, en unas estructuras de sostén de varias formas y complejidades. Un conidio puede ser pequeño, de forma globosa, piriforme, formado de una célula simple como las microconidias o multicelulares grandes con septación longitudinal y transversal, como las macroconidias, algunos ejemplos de hongos que presentan estas características son: Aspergillus, Penicillium, Alternaria, Microsporium y Trichophyton^{40, 15}.

2.2 REPRODUCCION SEXUAL

Las esporas sexuales se producen con menor frecuencia y número que las esporas asexuales.

Pueden ser producidas solamente bajo algunas condiciones especiales, así que pueden estar ausentes en cultivos de hongos sobre medios ordinarios.

La reproducción sexual se puede llevar a cabo en diferentes formas dependiendo de las características sexuales de los hongos, como son: la presencia de órganos sexuales diferenciados o indiferenciados, la formación de estructuras especializadas como ascas y basidias así como la característica de homotalismo y heterotalismo².

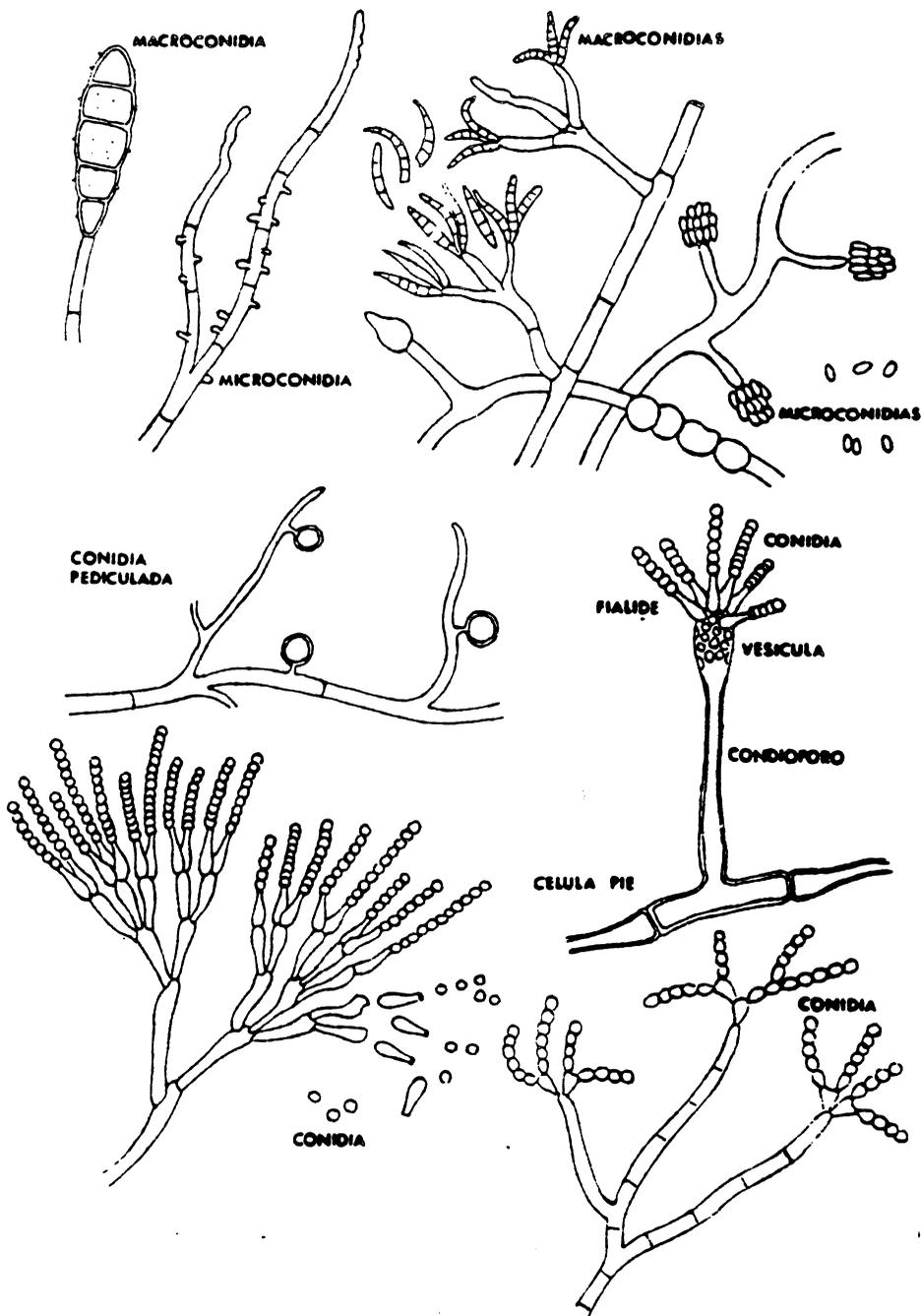


Fig. 3.6 Algunos ejemplos de Conidiosporas.

Como resultado de estas diferentes formas de reproducción se originan 4 variedades de esporas sexuales en las que se basa principalmente la separación de los hongos en clases: Ficomicetos (Oomicetos), Ascomycetos y Basidiomicetos² (Ver cuadro 3.1).

Cuadro 3.1
Clasificación de los hongos

C L A S E	ESPORAS ASEXUALES	ESPORAS SEXUALES.	MICELIO
Ficomicetos	endogenos ⁱ	Oosporas y Zigosporas	no septado
Ascomycetos	exogenos ⁱⁱ	ascosporas	septado
Basidiomicetos	exogenos	basidiosporas	septado
Deuteriomycetos Adelomicetos Fungi imperfecti	exogenos	ausentes	septado

i = Contenidos en sacos

ii = Presentes al final o al lado de las hifas.

Los siguientes tipos de esporas sexuales se encuentran en los hongos de interés - médico:

LAS OOSPORAS: resultan de la fertilización de una oosfera femenina por una zoospora. La oosfera está contenida dentro de un oogonio producido por el micelio (Ver Fig. 3.7-A).

ZIGOSPORAS: se forman a partir de la unión o coalecencia de dos ramificaciones - de hifas vecinas formándose un cuerpo esférico pigmentado en el punto de fusión, que constituye la zigospora. Los hongos que algunas veces forman este tipo de esporas son los del género Mucor y Rhizopus. Ambos son patógenos oportunistas del hombre y los animales¹⁵ (Ver Fig. 3.7-B).

ASCOSPORAS: en este caso una vesícula especial, denominada asca (saco), se forma con el proceso de fusión celular, un proceso sexual corto precede a la formación de esporas. Cada saco contiene esporas en número par. Los sacos están contenidos dentro de un cuerpo frutal llamado Ascocarpo (Ver Fig. 3.7-C).

BASIDIOSPORAS: se forman al final de una estructura en forma de bastón, el basidio, que generalmente se encuentra en grupos de cuatro. Este tipo de esporulación es característica de los hongos carnosos (Ver Fig. 3.7-D).

En el caso de los ascomycetos y Basidiomycetos macroscópicos las esporas sexuales se encuentran sobre o dentro de un estroma que presenta características propias - de forma, tamaño, color, consistencia, etc., según el género y la especie².

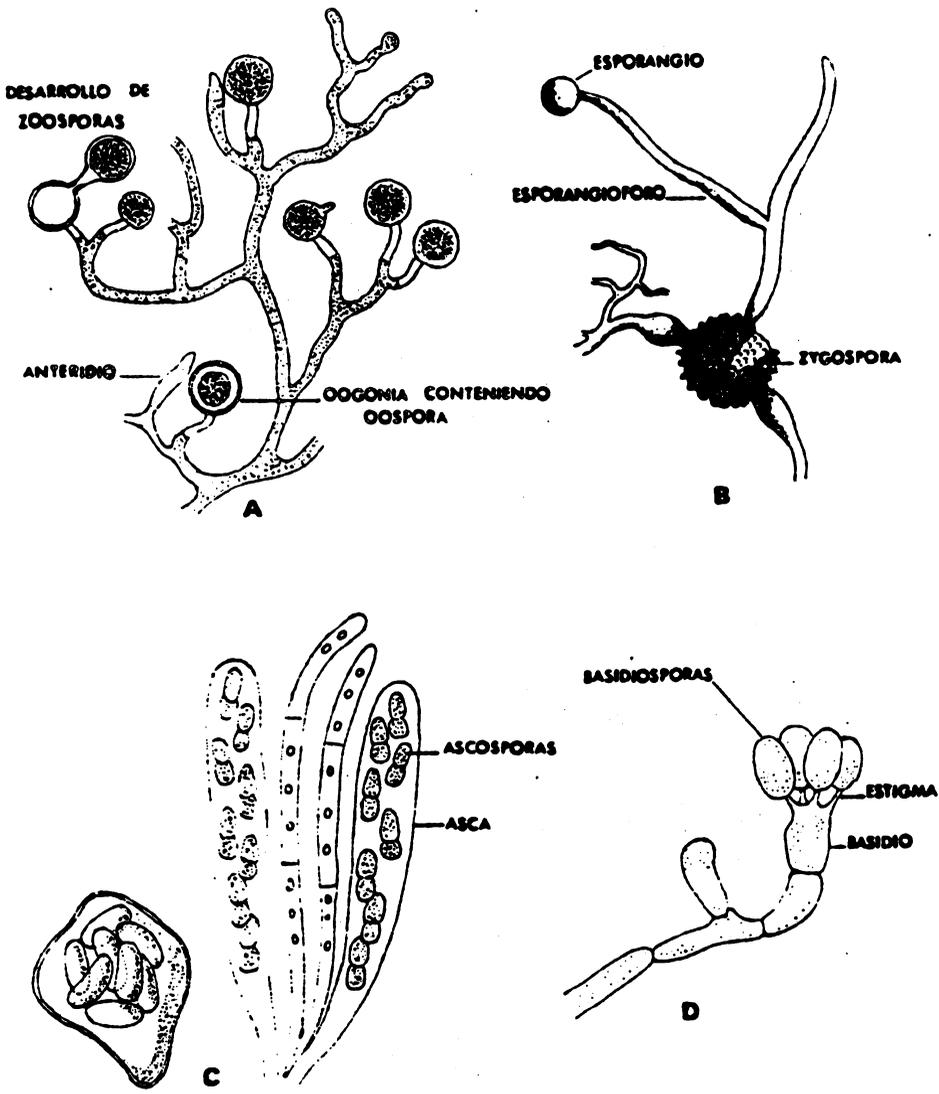


Fig. 3.7 Formación de esporas sexuales: A) Oosporas y Zoosporas; B) Zigosporas; C) Ascosporas; y D) Basidiosporas.

B. MICOLOGIA MEDICA VETERINARIA

Para comprender un poco mejor las infecciones micóticas que afectan a los animales domésticos y al hombre, es necesario tener un tipo de clasificación orientadora de las micosis. La más informativa, es la llamada CLASIFICACION CUTANEA DE LAS MICOSIS propuesta por el Dr. González Ochoa del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México, que comprende tres categorías:

- a) Micosis Exclusivamente Tegumentarias
- b) Micosis Inicialmente Tegumentarias
- c) Micosis Secundariamente Tegumentarias

El primer grupo como lo indica el término Exclusivo son producidas por un grupo de hongos que se desarrollan sólo en estructuras superficiales de la piel y sus anexos queratinizados; en este grupo se incluyen las Dermatofitosis (tiñas). Estas micosis son contagiosas, muy frecuentes y de fácil tratamiento. Las tiñas afectan a todas las especies de animales útiles al hombre².

Las micosis inicialmente tegumentarias son provocadas por un grupo de hongos que penetran a través de la piel o de las mucosas externas produciendo lesiones en el sitio de penetración, las cuales se van extendiendo con cierta lentitud hasta invadir los tejidos profundos tales como subcutáneo, muscular, articulaciones y -- huesos, tejido linfático y aun tejidos viscerales. Las más importantes de este grupo son las infecciones producidas por el género Candida (Candidosis), la Rinosporidiosis, las Maduromicosis (Micotomas), y la Esporotricosis. Estas micosis no son contagiosas, son poco frecuentes y no tienen un tratamiento específico excepto la Esporotricosis.

En las micosis "Secundariamente Tegumentarias", el hongo penetra por diversas -- vías extrategumentarias, produce lesiones internas importantes y posteriormente va a ocasionar lesiones en la piel o mucosas externas, esta invasión cutánea puede ser precoz o tardía dependiendo del hongo de que se trate y de la supervivencia del paciente y son estas manifestaciones visibles la única pista de que dispone el clínico en muchas ocasiones para realizar el diagnóstico presuntivo de la infección.

Existe otro grupo de enfermedades denominadas micosis miscelaneas (raras) dentro de las cuales podemos citar: La Aspergilosis y las Ficomicosis, las cuales tienen gran importancia en Medicina Veterinaria, por encontrarse involucradas en la presentación del denominado "Aborto Micótico"; además, es importante mencionar el problema de tipo alérgico que numerosos hongos anemofilos causan al hombre y a los animales por la excreción de micotoxinas².

1. COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DEMOSTRACION Y AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS

Los procedimientos de diagnóstico en Micología Médica están encaminados directamente a la demostración y al aislamiento de los hongos presentes en los tejidos y en los líquidos corporales. El diagnóstico de laboratorio, por lo tanto, no puede realizarse de una manera adecuada si las muestras clínicas remitidas al mismo, no son las recomendables o fueron obtenidas sin tomar las medidas asépticas adecuadas¹.

Para el diagnóstico de las micosis, pueden remitirse al laboratorio diversas muestras, según el tipo de infección y la región afectada (Ver cuadro 3.2).

1.1 MICOSIS EXCLUSIVAMENTE TEGUMENTARIAS

Los hongos que provocan micosis superficiales en los animales se localizan, generalmente, en el tejido muerto (queratina). Las muestras obtenidas en el caso de las dermatofitosis son los raspados cutáneos, pelo afectado, uñas, lana, y -- plumas en el caso de aves. El raspado cutáneo debe realizarse del borde de las lesiones que muestren actividad, previa desinfección del área⁶ (Ver Cap. I).

1.2 MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

La micosis inicialmente tegumentarias comprenden: la Candidosis, Rinosporidio-- sis, los Micetomas y la Esporotricosis. El material clínico que puede ser remitido al laboratorio en el caso de estas infecciones, incluye: los raspados cutáneos, costras y pus obtenida de abscesos abiertos, exudados que fluyan de las le siones localizadas y ganglios regionales, exudados obtenidos por aspiración, y muestras obtenidas por biopsia^{1, 6}.

1.3 MICOSIS SECUNDARIAMENTE TEGUMENTARIAS

Las infecciones por hongos que afectan de forma sistemática al organismo, pueden ser diagnosticadas mediante el examen de muestras tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo, exudados provenientes de abscesos y ganglios regionales, raspados del borde de lesiones y úlceras, tejidos obtenidos por biopsia, y tejidos obtenidos durante la necropsia (Ver Cap. I, para envío de muestras al laboratorio)¹.

Cuadro 3.2

Tipo de muestra y medios indicados para el aislamiento de hongos causantes de micosis

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<p><u>EXCLUSIVAMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u></p> <p>Dermatofitosis (Tiñas)</p>	<p>Escamas de piel Pelo afectado Raspado de uñas</p>	<p>Agar Micobiotic Agar Sabouraud + C & S '</p>
<p><u>INICIALMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u></p> <p>Candidosis</p>	<p>Raspado mucocutáneo Escamas de piel Raspado vaginal</p>	<p>Sabouraud + C & S ' y Agar Sabouraud</p>
<p>Rinosporidiosis</p>	<p>Biopsia de polipos nasales y oculares Raspado cutáneo</p>	<p>Ninguno</p>
<p>Esporotricosis</p>	<p>Pus de las lesiones ulcerativas Líquidos aspirados</p>	<p>Sabouraud + C & S ' y Agar sangre</p>
<p>Mycetoma (Maduromicosis)</p>	<p>Tejido para biopsia Líquidos aspirados Pus de las lesiones localizadas</p>	<p>Agar Sabouraud Agar BHI ' Agar sangre</p>

Continuación del Cuadro 3.2

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<p><u>SECUNDARIAMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u></p> <p>(Actinomycetos)</p> <p>Actinomycosis</p>	<p>Líquido espinal Pus y Exudados aspirados . Espudo Lavado bronquial</p>	<p>Agar BHI BHI con 0.2% de glucosa Medio de carne picada, a 37° C.</p>
<p>Nocardiosis</p>	<p>Igual al anterior</p>	<p>Agar Sabouraud Agar BHI + Sangre (incubado a temperatura ambiente y a 37° C). Técnica de la parafina.</p>
<p>(Hongos Levaduriformes)</p> <p>Cryptococcosis</p>	<p>Espudo, Orina Líquido espinal Pus de abscesos Raspado de piel lesionada</p>	<p>Sabouraud + Cloranfenicol Agar de Papa y Dextrosa/Urea-antibióticos. Medio de Creatinina (a 24° y 37° C) Medio de Niger.</p>
<p>Candidosis</p>	<p>Lavado bronquial Líquido espinal Espudo Orina, Hece</p>	<p>Sabouraud + C & S Agar Sabouraud (para las especies sensibles a los antibióticos).</p>

Continuación del Cuadro 3.2

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<p>(Hongos Difásicos)</p> <p>Coccidioidomicosis</p>	<p>Lavado bronquial Esputo, Orina Líquido espinal Raspado cutáneo Pus de abscesos y Senos afectados</p>	<p>Sabouraud + C & S'</p>
<p>Histoplasmosis</p>	<p>Sangre, Esputo Médula ósea Lavado bronquial Líquido espinal Pus de senos afectados y úlceras Raspado de piel lesionada.</p>	<p>BHI + antibióticos Agar Sangre de Sabhi + antibióticos BHI + 6% de sangre cultivado a 37° C.</p>
<p>Blastomycosis Norteamericana</p>	<p>Raspado de la perife- ria de las lesiones Orina, Esputo Pus de abscesos y heridas Lavado bronquial</p>	<p>Sabouraud + C & S' Agar BHI + antibió- ticos. BHI (sin antibióti- cos) a 37° C y Agar de Shabi a 37° C.</p>
<p>Blastomycosis Sudamericana</p>	<p>Biopsia de nódulos linfáticos Raspado de mucosas Esputo Lavado bronquial Raspado de la peri- feria de las le- siones.</p>	<p>Igual al Anterior</p>

Continuación del cuadro 3.2

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<p><u>MICOSIS</u> <u>MISCELANEAS</u></p> <p>Aspergilosis</p>	<p>Espuito Lavado bronquial Feto y Placenta</p>	<p>Agar Sabouraud + antibióticos</p>
<p>Mucormycosis</p>	<p>Tejido para biopsia Feto y Placenta Espuito Lavado bronquial</p>	<p>Agar Sabouraud + Cloranfenicol</p>

FUENTE: Beneke, E. S., 1970; Ajello L. y Col., 1975.

NOTA: C & S ' = Cloranfenicol y Cicloheximida.

Agar BHI = Agar de Infusión Cerebro- Corazón.

2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Dentro de los procedimientos de laboratorio para establecer un diagnóstico presuntivo de las micosis, el método más sencillo, consiste en realizar un examen directo de la muestra sobre un portaobjetos utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10 o 20%. Si a la observación microscópica, el resultado es negativo, no se debe descartar la posibilidad de que exista una infección micótica.

El diagnóstico definitivo del agente micótico se realiza mediante la demostración del hongo en las muestras y el aislamiento del mismo en medios de cultivo especiales. Sin embargo, no todos los casos sospechosos pueden ser diagnosticados mediante estos procedimientos, en tales situaciones, los cortes histopatológicos la inoculación de animales de experimentación, el examen radiológico (en las pequeñas especies), las pruebas inmunológicas y la técnica de anticuerpos fluorescentes, pueden ser utilizados como procedimientos adicionales en la confirmación de las infecciones por hongos⁶.

2.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

RASPADO CUTANEO

Para este tipo de muestras, se recomienda el examen directo utilizando una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 o 20% (Ver examen microscópico directo); otros métodos que pueden emplearse, son las preparaciones de hidróxido de potasio + glicerina, el hidróxido de potasio Ink, y la tinción de P.A.S. El cultivo en agar C-C Sabouraud debe realizarse para la identificación del género y la especie correspondiente.

En las lesiones sospechosas de infección por Candida albicans, se deberá realizar un frotis y se procederá a teñir por el método de Gram; el resto de la muestra se inocula en una placa de agar dextrosa Sabouraud¹.

PELO

Puede realizarse un examen directo del pelo, en el sujeto, empleando la lámpara de Wood. Los pelos infectados generalmente fluorescen de un color verde amarillento. Debe tomarse en cuenta que el diagnóstico de las tiñas empleando este procedimiento no es muy confiable, ya que sólo un número limitado de dermatofitos producen un material que da dicha fluorescencia cuando es expuesta a la luz ultravioleta. El uso de la lámpara de Wood, es como un medio "pantalla" para la búsqueda de portadores asintomáticos³⁶.

En cuanto al examen en fresco de los pelos, utilizando la técnica del KOH, es importante diferenciar la forma endotrix y la ectotrix de parasitismo, en la primera se pueden observar abundantes esporas redondas dentro del pelo y en la segunda fuera de éste rodeándolo a manera de manguillo (Ver Fig. 3.8), es importante reportar este tipo de parasitismo ya que esto, tiene un gran significado epidemiológico. Otra parte de la muestra, se inocula en agar Micobiotic, o bien en agar C-C Sabouraud.

PUS Y EXUDADOS

El examen de estas muestras puede realizarse en forma directa, o bien, se pueden agregar 1 o 2 gotas de KOH al 10% para aclarar la preparación. Pueden observarse, dependiendo el tipo de micosis, tubos germinales, células grandes conteniendo en-

ESTRUCTURAS PARASITARIAS EN PELO.

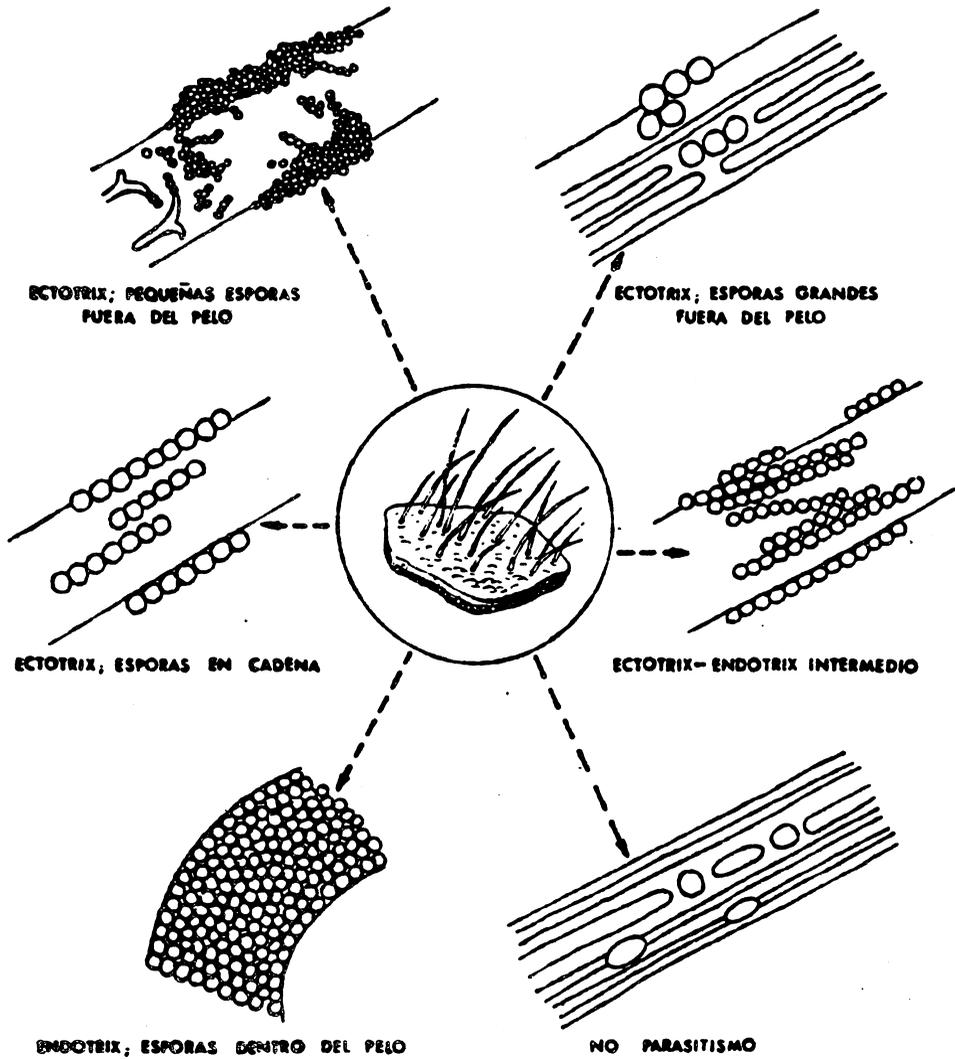


Fig. 3.8

dosporas o bien, gránulos de azufre.

Los frotis de pus se debe teñir por el método de Gram para demostrar fragmentos - de hifas, pseudomicelios o estructuras tubulares, las cuales tienen afinidad por el colorante básico. Los gránulos de azufre pueden ser tratados por el método de ácido resistentes.

Las muestras remitidas en recipientes estériles se destinan para la inoculación - de medios de cultivo específicos¹.

LIQUIDO CEPALORAQUIDEO

El líquido obtenido en tubos o jeringas estériles, es centrifugado a 2000-2500 -- rpm., durante 15 minutos, y el sedimento se observa al microscopio, donde pueden observarse células ovaladas o tubulares; otra parte del sedimento se tiñe para de mostración de cápsula, cuando se sospecha de una infección por Cryptococcus neo-- formans, utilizando la técnica de la tinta china o la tinción de nigrosina.

El sedimento puede tratarse por el método de Gram y también por el método de áci-- do resistentes, en el caso de infecciones por Actinomyces⁶.

ESPUTO

Los frotis de esputo, son tratados de manera similar a los de pus y exudados. La tinción de Gram es útil para demostrar hifas de Actinomyces, células levadurifor mes de Candida albicans, y artrosporas, la tinción de ácido resistentes, nos ayuda a identificar el género Nocardia; si se sospecha de infección por Cryptococcus,

puede utilizarse el método de la tinta china¹.

MEDULA OSEA Y SANGRE

Los frotis realizados con este tipo de material, son teñidos con los colorantes de Giemsa y de Wright en los casos agudos de Histoplasmosis. Las muestras provenientes de jeringas, son inculadas directamente en un medio de cultivo adecuado.

MATERIAL DE BIOPSIA Y NECROPSIA

El material obtenido por biopsia o durante la necropsia, puede ser preparado por fijación para realizar cortes histopatológicos, o bien, pueden ser inculados directamente en algún medio de cultivo.

Los raspados cutáneos y el material de biopsia obtenidos en el caso de Rinosporidiosis, se deben examinar directamente, o fijarse para histopatología. El cultivo en forma meciliar no puede ser llevado a cabo en el laboratorio, ni los animales de laboratorio han sido infectados experimentalmente. Sin embargo, Grover (1970), obtuvo la maduración de las esporas y esporangios en material de biopsia colocado en el medio sintético T.C. 199³⁶.

2.2 EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO (Técnica del KOH al 10%)

El examen microscópico de las preparaciones en fresco, no teñidas tales como orina, exudados y líquidos peritoneales o pleurales pueden demostrar la presencia de estructuras características (esporas, esferulas, hifas, etc.), en la mayoría de los casos.

TECNICA DEL KOH AL 10%

Las preparaciones utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10 o 20%, son un método rápido y confiable para el diagnóstico de las tiñas, cuando examinamos muestras de pelo o raspados cutáneos. Este procedimiento también puede ser aplicado a muestras tales como pus y exudados.

En el examen microscópico del material biológico, pueden identificarse los filamentos de los dermatófitos que pueden ser largos, cortos, ramificados, fragmentados y de un diámetro regular de 3 micras, es importante el saber diferenciarlos de filamentos de hongos contaminantes o de artefactos diversos^{24, 31}.

El material debe primero examinarse a bajo aumento con el diafragma parcialmente cerrado para obtener contraste visual; examinando el material se debe enfocar primero un pelo que aparezca roto o deformado y observarse a mayor aumento. En el tejido que es examinado, se encuentran con mayor frecuencia esporas, más bien que hifas, las cuales generalmente están dispuestas en racimos (mosaico) o en cadenas sobre la superficie del pelo³⁶ (Ver Fig. 3.8).

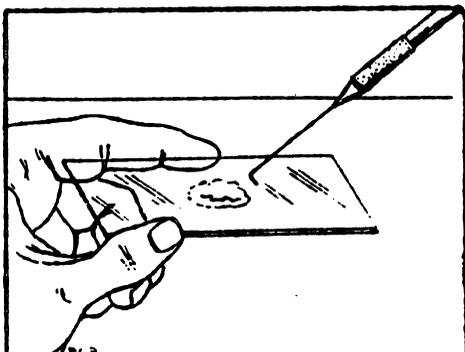
La ventaja del método microscópico directo para el diagnóstico, sobre los otros procedimientos, es de que en un corto período se puede establecer un diagnóstico definitivo e instituirse la terapia desde el examen inicial del paciente³⁶.

PRECAUCIONES:

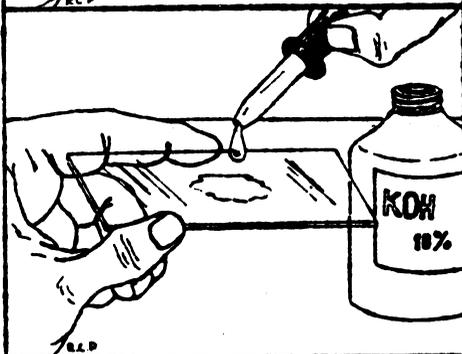
- Debe tenerse cuidado en no colocar una cantidad excesiva de muestra (pelo, escamas o exudados) sobre el portaobjetos, ya que esto puede impedir la observación de los elementos fungales.
- En términos generales, mientras más tiempo permanezca el material en el hidróxido de potasio, es más exacto el examen; el dejar reposar las preparaciones durante toda la noche en una cámara húmeda facilita ampliamente la observación de las estructuras¹⁴.

PROCEDIMIENTO: 14, 31

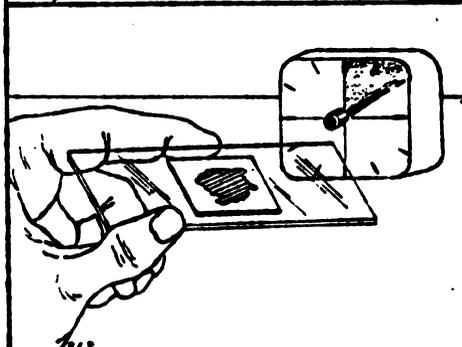
1. Frente al mechero y sobre un porta-objetos, se deposita una pequeña -- cantidad de pelos y escamas raspadas de la periferia de la lesión.



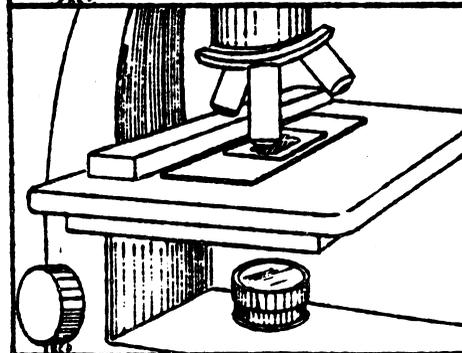
2. Se agregan 2 o 3 gotas de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 o 20%.



3. Se deja en reposo la preparación -- durante 10 o 15 minutos, antes de colocar el cubreobjetos; un calentamiento ligero de la laminilla -- acelera el aclaramiento de las muestras.



4. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 X) para la identificación de estructuras.



2.3 CULTIVO DE LOS HONGOS

Los hongos obtienen su alimento como parásitos infectando organismos vivos, o como saprófitos atacando sustancias orgánicas muertas. La mayoría de los hongos - conocidos, parásitos o no, son capaces de vivir sobre materia orgánica muerta, - como lo demuestra el hecho de poder cultivarlos artificialmente sobre medios sintéticos.

La mayoría de los hongos se desarrollan entre los 0° y 35° C, pero las temperaturas óptimas están entre 20° y 30° C. En contraste con las bacterias, los hongos prefieren un medio ácido para su crecimiento, siendo el óptimo alrededor de pH - 6.0 para la mayoría de los géneros³.

Existen una gran variedad de medios de cultivo específicos para cada género, y - aún, para cada especie de hongo, pero las cajas o los tubos con Agar dextrosa Sabouraud (pH 5.6), son el medio estándar utilizado para el aislamiento de los hongos; pueden además emplearse cajas preparadas con agar de infusión cerebro-corazón (agar BHI), o agar sangre adicionados o no con antibióticos, para favorecer el desarrollo de las formas miceliales y levaduriformes (Ver Cuadro 3.2).

El sembrado de las placas y tubos, conteniendo el medio de cultivo, se realiza -- empleando un asa de inoculación en forma de L o bien utilizando el asa bacteriológica. La técnica generalmente es similar a la recomendada para Bacteriología general; sin embargo, como en el caso de las dermatofitosis, la muestra es inoculada por picadura en sitios diversos del medio de cultivo.

El examen de los medios de cultivo, inoculados con material clínico, varía depen-

diendo del género en cuestión. Los hongos levaduriformes requieren de una incubación de 24 horas a 37° C (como las bacterias); por el contrario, las formas miceliales requieren de un período de incubación más prolongado, que varía de una a tres semanas a temperatura ambiente.

Las características generales que nos permiten realizar una identificación preliminar de los hongos en cultivo, las podemos agrupar en dos formas:^{1, 2}

- 1) Morfología Colonial: es importante observar para todos los tipos de crecimiento;
 - a. Aspecto de la colonia
 - b. Morfología general (plana, agrupada, con pliegues regulares o irregulares)
 - c. Textura: Levaduriforme, pulvurulente, granular, vellosa o algodonosa
 - d. Tiempo de crecimiento o desarrollo
 - e. Pigmentación y la difusión del pigmento al reverso de la colonia.

2) Tipos de Micelio:

<u>Unicelular</u>	<u>Filamentoso</u>	
Pseudomicelio	Macrosifonado	Septado
Pigmentado	Microsifonado	Pigmentado
Hialino	Cenocítico	Hialino

Las características macroscópicas de las colonias y la pigmentación son medios -- útiles para la identificación, pero en la identificación final se hace necesario el desarrollo pleno de todas sus estructuras para así realizar una apreciación -- exacta de ellas.

Ya que el estudio de la morfología de las esporas y las relaciones espóra-micelio son necesarias para la identificación final del hongo, los micólogos en ocasiones suplementan sus cultivos, mediante el cultivo del hongo en portaobjetos, utilizando el método del microcultivo (Ridell, 1950), el cual permite un estudio exacto de los hongos miceliales³⁶.

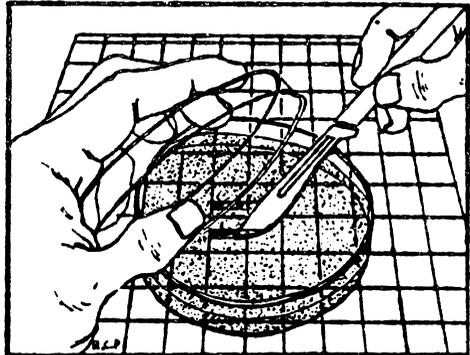
2.4 METODO DEL MICROCULTIVO

En estos cultivos el crecimiento se realiza en una cámara húmeda, preparada con una rodaja de papel filtro que se coloca en el fondo de una caja de Petri, una varilla de vidrio doblada, un portaobjetos y un cubreobjetos. Este paquete se esteriliza en el autoclave y se almacena hasta ser utilizado.

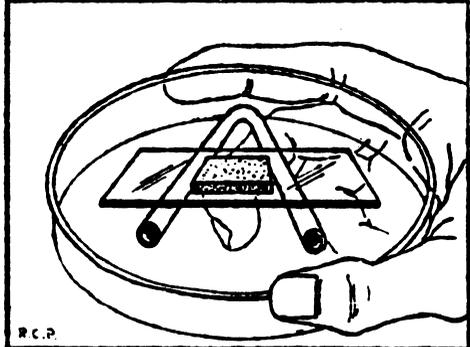
NOTA: Cuando se trabajan con cultivos de hongos, se debe de tener cuidado para evitar la contaminación del laboratorista y del área de trabajo; se emplean técnicas asépticas; es conveniente colocar una toalla de papel sobre el área de trabajo de la mesa y humedecerla con Amphyl al 2%, aceite de pino, fenol o algún otro desinfectante, la toalla puede doblarse y desecharse -- después de haber terminado el trabajo³⁶.

PROCEDIMIENTO: 1, 14

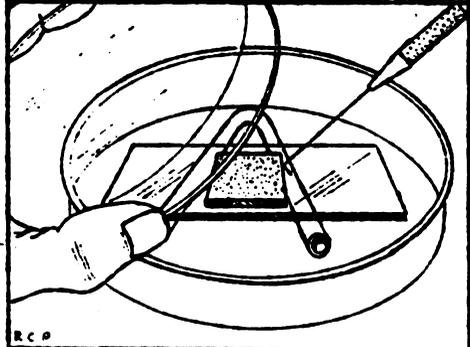
- Preparar un placa con 30-35 ml de medio.
- Se corta un bloque de aproximadamente 1 cm^2 , utilizando material y técnicas asépticas.



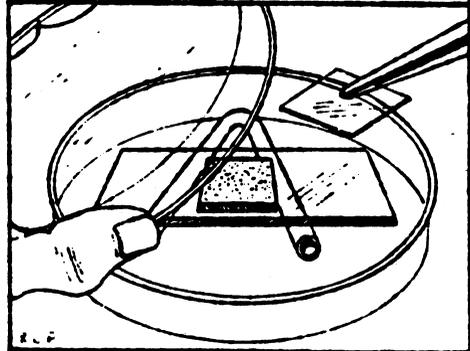
- Se transfiere el bloque de agar a la superficie del portaobjetos.



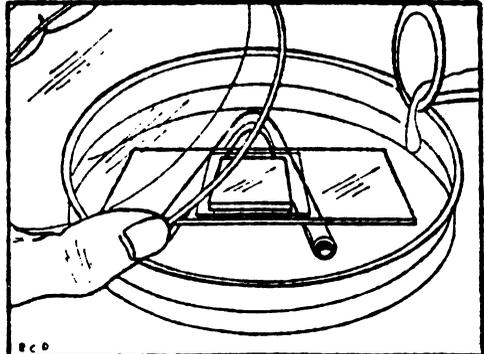
- Se inoculan los cuatro lados del bloque de agar con las esporas o el crecimiento micelial del hongo que se está estudiando.



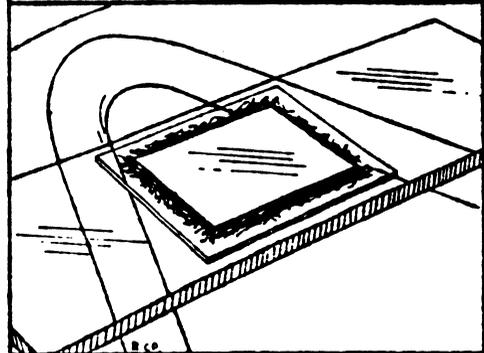
- Se coloca un cubreobjetos utilizando unas pinzas previamente flameadas encima del bloque, haciendo una ligera presión.



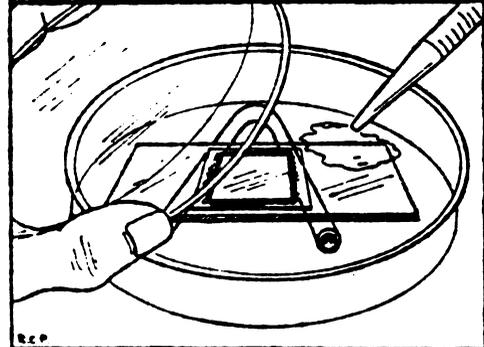
- Se adicionan aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril o una solución al 10% de glicerina estéril teniendo cuidado de que el nivel de líquido NO toque el portaobjetos.



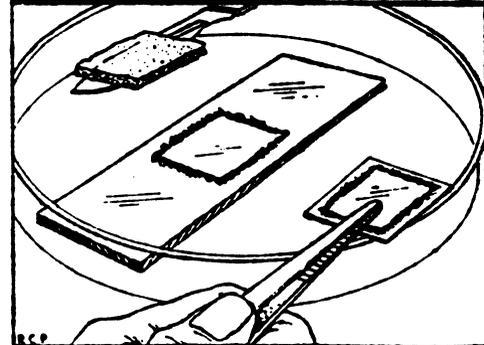
- Se incuba el microcultivo a 28° C hasta observar sobre el medio el desarrollo del micelio. Cuando el micelio toque tanto al porta como al cubreobjetos, puede realizarse su observación.



- Antes de observar, se retira el agua destilada con pipeta y se sustituye por formol al 10% (10 ml). Se deja actuar por espacio de 2 a 24 horas.

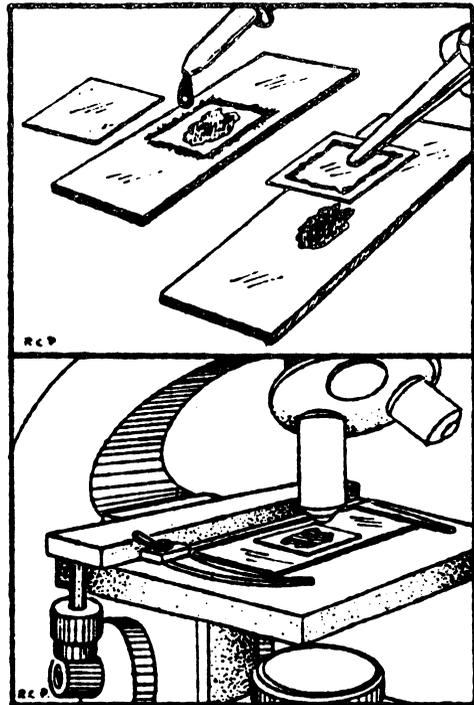


- Posteriormente se retira el medio de cultivo con un bisturí previamente flameado y obtenemos el hongo sobre el porta y cubreobjetos.



- Para el examen, se agregan 1 o 2 gotas del colorante azul de algodón -- lactofenol en un portaobjetos limpio y se coloca el cubreobjetos del microcultivo en el colorante; por otro lado, al portaobjetos del microcultivo se le agrega el colorante y un cubreobjetos limpio.

- Para el examen microscópico, se observa primero con bajo aumento y después con el objetivo de inmersión.



NOTA: Con este procedimiento se obtienen dos hermosas preparaciones, con el micelio, esporas y conexiones intactas; estas preparaciones pueden hacerse semipermanentes, sellando los bordes de los cubreobjetos con barniz para uñas³⁶.

2.5 TECNICAS DE TINCION

Los métodos de tinción utilizados para la demostración de los hongos incluyen la tinción de Gram, el método de Ziehl - Neelsen y la modificación de Kinyoun (para ácido-resistentes), así como la tinción para cápsula. Estas tinciones se describieron con anterioridad en el capítulo correspondiente a Bacteriología; en esta ocasión, describiremos algunas de las técnicas rutinarias empleadas en el laboratorio de Micología general.

a. TINCION CON AZUL DE ALGODON LACTOFENOL

Esta es una excelente preparación utilizada para la demostración de la mayoría de los hongos meciliales^{1, 2, 14}.

REACTIVOS

Solución A: Solución Aclarante (Lactofenol)

Cristales de Fenol.....	20 g
Acido Láctico.....	20 g
Glicerina.....	40 g
Agua Destilada.....	20 ml.

Dísolver en el agua destilada el fenol, en baño María, agregar el ácido láctico la glicerina.

Solución B; Azul de Algodón Lactofenol

Colorante Azul de Algodón	0.05 g
---------------------------------	--------

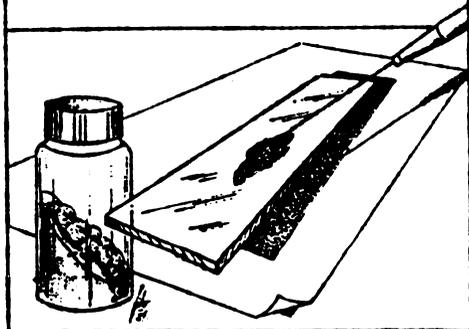
A los 80 ml del aclarante anterior se le adiciona el colorante azul de algodón y se filtra antes de usarse.

PROCEDIMIENTO

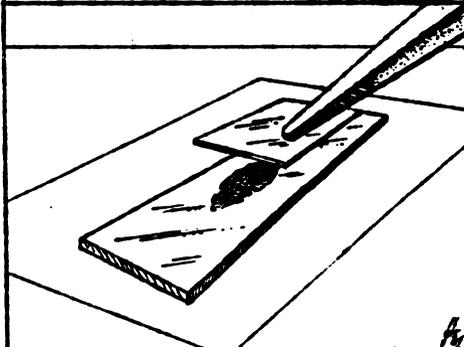
- Poner un portaobjetos sobre una superficie transparente e iluminada, si es to no es posible, poner el portaobjetos sobre una hoja de papel blanco. Agregar una pequeña gota de azul de algodón lactofenol en el centro del portaobjetos.



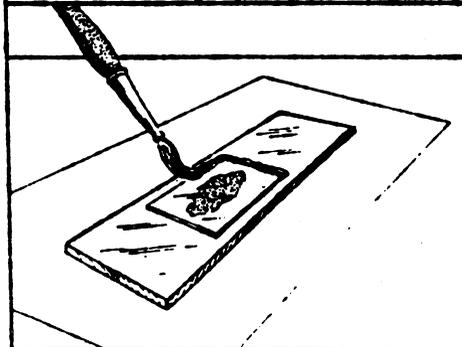
- Remover un fragmento de la colonia del hongo (aproximadamente 1 a 2 mm dentro de la periferia) con un asa, y depositar sobre la gota, del colorante.



- Desbaratar el fragmento de la colonia utilizando el asa de inoculación o -- aguja de disección.



- Montar la preparación dejando caer un cubreobjetos sobre ella, no presionar el cubreobjetos porque esto podría -- desprender algunas estructuras del -- hongo¹.



NOTA: Estas preparaciones pueden guardarse por meses quitando el exceso de colorante a los lados del cubreobjetos y rociándolo con -- spray Merckoglas o sellándolo con esmalte de uñas incoloro.

b. TINCIÓN CON AZUL DE ALGODON ACETICO

REACTIVOS:

Azul de algodón	0.5 g
Acido acético	3.0 g
Agua destilada	100 ml.

PROCEDIMIENTO²

- Fijar con alcohol metílico cubriendo el portaobjetos y dejando evaporar. (Microcultivo).
- Agregar la solución de azul de algodón acético por 20 minutos, calentando hasta la emisión de vapores.
- Lavar rápidamente con agua corriente.
- Pasar por alcohol absoluto de 96°.
- Pasar por alcohol absoluto.
- Poner en xilol hasta que se transparente la preparación.
- Montar en bálsamo de Canada o resina sintética.
- Observar al microscopio, empleando primero, el objetivo seco fuerte.

c. TINCIÓN CON ACIDO PERIODICO DE SCHIFF (PAS).

Es una excelente tinción utilizada para demostrar hongos en muestras de raspados cutáneos y cortes de tejido^{2, 6, 14}.

REACTIVOS:

Solución A: Acido Peryódico

Acido Peryódico 5.0 g
Agua destilada 100 ml.

Poner en un frasco con tapón de rosca.

Solución B: Solución de fucsina básica

Fucsina básica 0.1 g
Alcohol etílico (95%) 5.0 ml.
Agua destilada 95.0 ml.

Mezclar el alcohol etílico y el agua, añadir cuidadosamente la fucsina a la mezcla y agitar la solución con movimientos rotatorios.

PROCEDIMIENTO

- Poner una capa delgada de albúmina de Meyer sobre un portaobjetos limpio. Sobre ésta colocar algunos fragmentos de escamas de piel o uñas utilizando una aguja de disección. No fijar por calor. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente durante toda la noche o a 37° C por una o dos horas; si se hace indispensable se puede utilizar una placa de calentamiento a 60-65°C.
- Poner el portaobjetos en alcohol etílico absoluto por 1 minuto.
- Secar la preparación e inmediatamente ponerla en ácido peryódico al 5% por espacio de 5 minutos.
- Lavar en agua corriente por 2 minutos.
- Poner en fucsina básica por 2 minutos.
- Lavar por 2 minutos en agua corriente.
- Sumergir el portaobjetos en una solución de Metabisulfito de sodio, por espacio de 3-5 minutos.

- Lavar en agua corriente por 5 minutos.
- Deshidratar pasando a través de alcohol al 70%, 85%, 95% y absoluto a intervalos de 2 minutos.
- Poner en xilol por 2 minutos y montar con un cubreobjetos y resina sintética.

INTERPRETACION

La mayoría de los hongos se tiñe de color Magenta; el material restante presenta un color rosado o rojizo.

Ocasionalmente las bacterias así como los neutrófilos pueden retener la fucsina - pero no debe haber dificultad en diferenciar estas estructuras de los elementos - micóticos.

d. TINCION DE GIEMSA

Esta tinción y otras (Gridley, Tinción de PAS, o la técnica de Gomori - plata metenamina), son utilizadas en la demostración de Histoplasma capsulatum en las células reticulo endoteliales ^{6, 13, 26}.

REACTIVOS:

Solución A: Colorante de Giemsa

- Polvo de colorante de Giemsa .. 600.0 mg
- Alcohol metílico (absoluto)..... 50.0 ml
- Glicerina (neutra) 50.0 ml.

Moler el colorante en un mortero, añadir la glicerina y moler de nuevo, pasar a un frasco color ámbar, añadir el alcohol y mezclar vigorosamente.

Solución B: Solución Tamponada de Wright (pH 7.0).

Fosfato Monopotásico.....	6.77 g
Fosfato de Sodio (dibásico).	2.59 g
Agua destilada.....	1000 ml.

Solución C: Solución Colorante

Colorante de Giemsa	2 ml
Solución Buffer	6 ml.

PROCEDIMIENTO

- Fijar el frotis con alcohol metílico al 100% durante 3-5 minutos. Una técnica más exigente requiere una fijación con vapores de Tetróxido de Osmio al 2%, -- por 20-30 minutos.
- Sumergir en líquido de Giemsa diluido (se recomienda una parte de colorante en 19 partes de solución tamponada de Wright) durante 15 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Secar al aire o utilizar papel secante.

3. MICOSIS EXCLUSIVAMENTE TEGUMENTARIAS

DERMATOFITOSIS

Las Dermatomifosis o Tiñas, son unas de las micosis más frecuentes dentro del grupo de las micosis exclusivamente tegumentarias.

La Dermatomifosis es una enfermedad intertegumentaria cuyos agentes etiológicos, son diversos hongos denominados genéricamente, dermatófitos; estos microorganismos

presentan un tropismo estricto hacia los tejidos queratinizados, de tal manera, que cuando se encuentran en el huesped, habitan y están situados en las capas más superficiales del mismo afectando la piel, uñas (garras y cuernos), y al pelo -- (plumas y lana)³⁶.

Los dermatófitos están comprendidos dentro de tres géneros: Microsporum, Trichophyton y Epidermophyton; con diferentes especies los dos primeros géneros y el tercero con una sola especie: Epidermophyton floccosum, el cual es un parásito exclusivo del hombre. En el cuadro 3.3, se muestran las especies de dermatófitos que han sido reportados en los animales domésticos⁶.

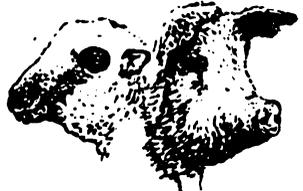
3.1 CLASIFICACION

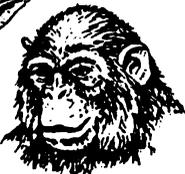
El probable lugar de origen de los dermatófitos es el suelo. Un número significativo de microorganismos han cambiado su existencia saprofitica en al naturaleza, por una existencia parasitaria en la piel animal o humana. Sobre la base preferencial de los dermatófitos, estos microorganismos pueden ser clasificados como geofílicos (afectos al suelo) o queratofílicos (afectos a la queratina). Otra -- clasificación de estos hongos ha sido realizada tomando en cuenta: 1) la preferencia de los microorganismos para el tejido animal o humano (Zoo-fílicos o Antropofílico); 2) la posición de las esporas fungales dentro o en la superficie del pelo (Endotrix o Eto-trix); 3) por las características del cultivo; y 4) en el hombre, la región del cuerpo que es preferentemente afectada (Tinea capitis, Tinea barbae, etc.)^{42, 48}.

La clasificación de las tiñas en base a las manifestaciones clínicas y a la localización de las lesiones, no puede llevarse a cabo en los animales domésticos, ya

CUADRO 3. 3

Dermatofitos en Medicina Veterinaria

					
M. canis	común	frecuente	reportado	ocasional	reportado
M. distortum	frecuente	reportado	-	-	-
M. audouinii	frecuente	reportado	-	-	-
T. (M?) gallinae	reportado	reportado	-	-	-
M. gypseum	ocasional	frecuente	reportado	-	reportado
M. nanum	-	-	-	-	común
M. persicolor	-	reportado	-	-	-
M. cookei	reportado	reportado	-	-	-
M. vanbreuseghemii	-	reportado	-	-	-
T. ajelloi	-	dudoso	dudoso	-	-
T. simii	-	reportado	-	-	-
T. mentagrophytes	ocasional	frecuente	ocasional	ocasional	ocasional
T. equinum	-	reportado	-	-	-
T. verrucosum	reportado	reportado	común	ocasional	reportado
T. megninii	-	reportado	-	-	-
T. rubrum	-	reportado	-	-	-
T. violaceum	reportado	-	-	-	-
E. floccosum	-	reportado	-	-	-

					
M. canis	ocasional	ocasional	frecuente	-	-
M. distortum	reportado	-	reportado	-	-
M. audouinii	-	-	reportado	-	-
T. (M?) gallinae	-	reportado	reportado	común	-
M. gypseum	frecuente	frecuente	ocasional	-	-
M. cookei	-	-	reportado	-	-
M. vanbreuseghemii	-	reportado	-	-	-
T. ajelloi	dudoso	-	-	-	-
T. simii	-	-	frecuente (India)	frecuente (India)	-
T. mentagrophytes	ocasional	común	frecuente	-	-
T. equinum	común	-	-	-	-
T. verrucosum	ocasional	-	-	-	-
T. rubrum	-	-	reportado	-	-

que estas son extremadamente variables. La infinita variedad de lesiones se refiere, por una parte, a la interacción del dermatófito y a la capacidad reactiva del huésped por la otra, en un extremo está el portador asintomático; como punto intermedio, la lesión clásica "anillada", la cual se aprecia como una área circular de alopecia, con una zona central de curación y una reacción inflamatoria en la periferia, y en el otro extremo está la lesión violenta, eruptiva nodular o - tumorosa, referida como Kerion³⁶ (Ver Fig. 3.9).

3.2 DIAGNOSTICO

Como todas las enfermedades infecciosas, el diagnóstico definitivo de las tiñas, depende de la demostración del agente causal. El diagnóstico basado en las características clínicas de la lesión es difícil con la excepción de los casos típicos de la lesión "anillada"; otras dermatosis tales como infecciones bacterianas, urticaria, seborrea y tumores pueden erróneamente ser confundidas con una infección dermatofítica.

El diagnóstico de las dermatofitosis, en el laboratorio, incluye los siguientes - procedimientos:

EMPLEO DE LA LAMPARA DE WOOD. Algunos de los dermatófitos tienen la característica de fluorescer en el pelo afectado, lo cual se puede demostrar con la lámpara - fluorescente de Wood, siendo esta característica un paso de ayuda en el diagnóstico. El fenómeno de fluorescencia verde amarillenta se produce como resultado de la interacción huésped-parásito, la fluorescencia se observa infortunadamente, sólo en el caso de: Microsporum canis, M. distortum y M. audouinii y en ocasiones Trichophyton tonsurans y T. schoenleinii, por lo tanto, el empleo de la lámpara -

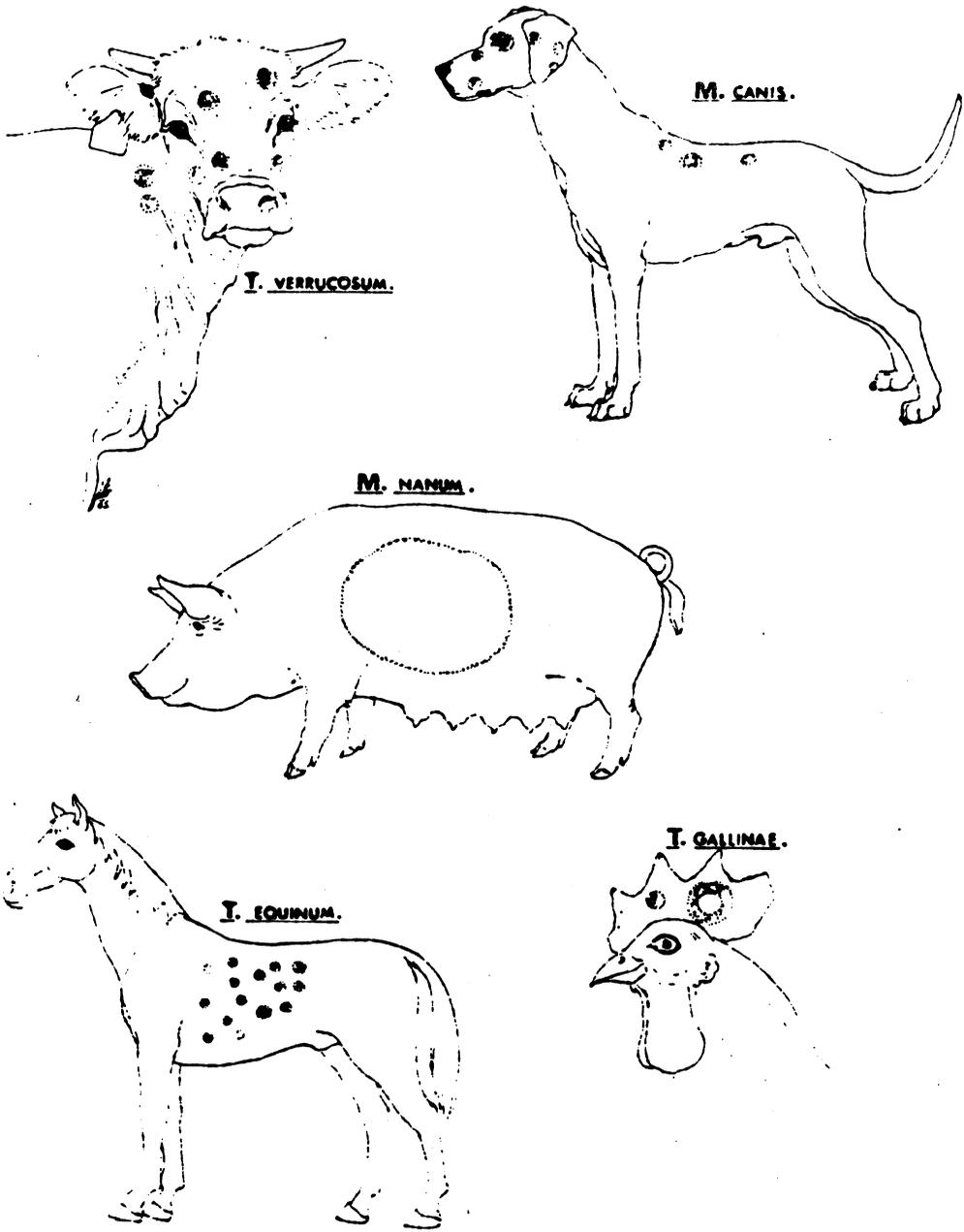


Fig. 3.9 Localización más frecuente de las tiñas en los diferentes animales domésticos.

de Wood tiene un valor diagnóstico limitado y sólo da resultados positivos en casos de infecciones por estos microorganismos^{1, 36, 40}.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO. El examen microscópico del pelo o de raspados cutáneos, es un método rápido y confiable para el diagnóstico de las tiñas, previo aclaramiento o transparentamiento de la muestra utilizando la técnica del KOH (Ver antes). Este examen directo nos permite apreciar las estructuras fungales y su acción en los tejidos, se observan microscópicamente, artrosporas, las cuales pueden localizarse dentro o en la superficie del pelo (Ver Fig. 3.8), y fragmentos de micelio cuando examinamos raspados cutáneos, utilizando los objetivos seco débil o seco fuerte (Ver cuadro 3.4); en cambio en su estado saprofitico forman estructuras más complejas y diversas que se utilizan, precisamente para su separación en géneros y aún en especies (Ver Figs. para cada género)^{2, 31}.

CULTIVO (asilamiento). La identificación del género y la especie se establece por la observación de la morfología colonial tanto macro como microscópica en los medios de cultivo. (Ver Figs. 3.10 - 3.19).

Los cultivos se realizan inoculando las muestras (pelo y escamas de piel) en medios de cultivo como el agar Micobiotic, agar Micosel, o bien el medio de Sabouraud dextrosa conteniendo cloranfenicol 0.05 mg/ml y cicloheximida o actidiona - 0.05 mg/ml (Sabouraud C - C). La acidez del agar Sabouraud inhibe la mayoría de bacterias; por otro lado el cloranfenicol restringe el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe la mayoría de los hongos contaminantes⁴⁰.

La inoculación del medio, puede realizarse de la siguiente manera:

- Tomar con el asa o aguja de disección estériles algunos fragmentos de la mues-

tra y depositarlos en el centro de 2 tubos con medio de Sabouraud dextrosa y 2 con medio de Micosel agar.

- Incubar a 28° C por dos semanas. La incubación puede prolongarse hasta por 30 días.
- Observar las características macroscópicas de la colonia obtenida (no pasar -- por alto la pigmentación al reverso de la placa).
- Realizar un Microcultivo para llegar a la identificación correcta del hongo, - siguiendo la técnica descrita anteriormente.

NOTA: Para el desarrollo de ciertos dermatófitos es necesario el enriquecimiento del medio con vitaminas, por ejemplo, Trichophyton equinum requiere de ácido nicotínico y T. verrucosum requiere tiamina e inositol; por otra parte, T. verrucosum crece mejor y más rápido a 37° C que a temperatura ambiente³⁶.

DERMATOPHYTE TEST MEDIUM (D.T.M.). Como su nombre lo indica, el D.T.M. (Taplin y Col., 1969) es un medio diferencial exclusivo para este tipo de hongos, que ha -- mostrado una precisión de 97% de 3000 casos aprobados. El medio es originalmente de color amarillo, sólido que contienen Glucosa, Phytona, Cloranfenicol, Cicloheximida, Sulfato de Gentamicina y Rojo de fenol como indicador de pH⁶.

La prueba consiste en inocular el medio con la muestra problema, los dermatófitos hacen virar a rojo el indicador de pH cuando se desarrollan en este medio imprimiéndole al mismo el color rojo; por el contrario, si la muestra inoculada en el mismo contenía otro tipo de hongo (levaduras u hongos saprofitos) o bacterias causantes de dermatosis, el medio permanece del color original⁴⁰.

Cuadro 3.4

Diagnóstico preliminar de las tiñas en animales a partir del material clínico

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES KOH	
	Raspados de piel	Pelo
<u>Microsporum canis</u>	Fragmento de hifas septadas y cadenas de artrosporas redondas.	Vaina en mosaico de pequeñas esporas (2 - 3 μ) que rodea completamente el pelo en la base (ectotrix). El micelio dentro del pelo está dispuesto paralelamente a su longitud (Ver Fig. 3.10).
<u>Microsporum audouinii</u>	Micelio fragmentado y cadenas de artrosporas.	Igual a <u>M. canis</u> (Ver Fig. 3.11).
<u>Microsporum gypseum</u>	Micelio y masas muy grandes de artrosporas, algunas en cadenas.	Esporas grandes (5 - 8 μ) en cadenas o masas irregulares en la superficie de los pelos (ectotrix). El micelio está dispuesto paralelamente a su longitud (Ver Fig. 3.12).
<u>Microsporum nanum</u>	Micelio ramificado	Vaina de pequeñas esporas (2 - 3 μ) que rodea el pelo en la base, (ectotrix). El micelio está dispuesto paralelamente a su longitud (Ver Fig. 3.13).

FUENTE: Jungerman y Schwartzman, 1977.
Beneke y Rogers, 1970.

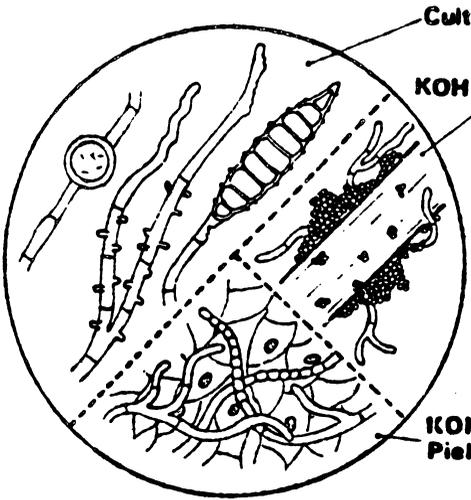


Fig. 3.10 Microsporium canis.

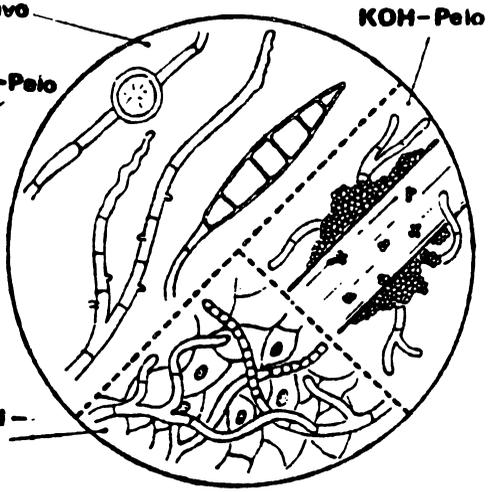


Fig. 3.11 Microsporium audouinii

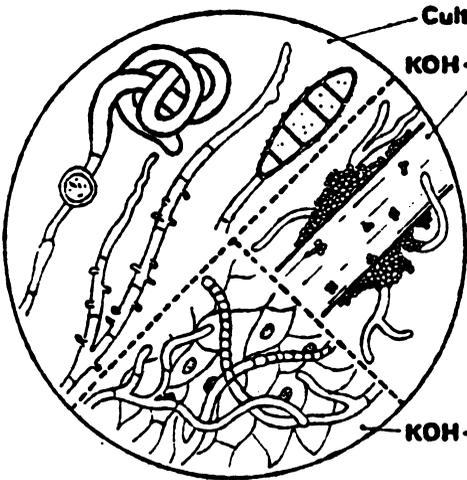


Fig. 3.12 Microsporium gypseum

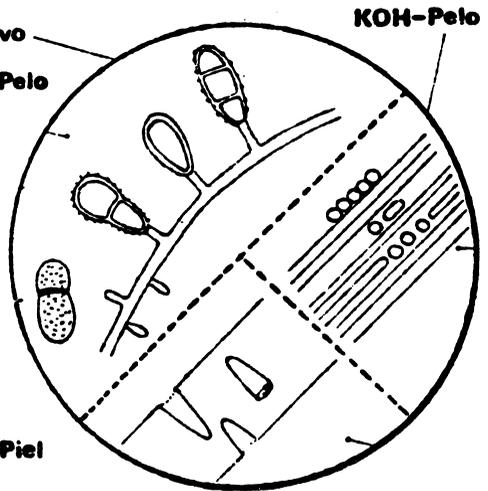


Fig. 3.13 Microsporium nanum.

Cuadro 3.4

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES DE KOH	
	Raspados de piel	Pelo
<u>Trichophyton rubrum</u>	Micelio ramificado	La invasión del pelo es rara. En animales de experimentación, se han observado cadenas de esporas fuera del pelo y micelio dentro de él. (Ver Fig. 3.14).
<u>Trichophyton tonsurans</u>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Los fragmentos de pelo, presentan en su interior masas densas de color oscuro, las cuales, corresponden a esporas de gran tamaño (4 - 7.5) micras en cadena (endotrix). (Ver Fig. 3.15).
<u>Trichophyton verrucosum</u>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Vainas o cadenas aisladas de grandes esporas (5 - 10 μ) en la superficie del pelo (ectotrix). (Ver Fig. 3.16).
<u>Trichophyton equinum</u>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3.5 - 8 μ) en la superficie del pelo (ectotrix) Micelio dentro del pelo. (Ver Fig. 3.17).

FUENTE: Jungerman y Schwartzman, 1977.
Beneke y Rogers, 1970.

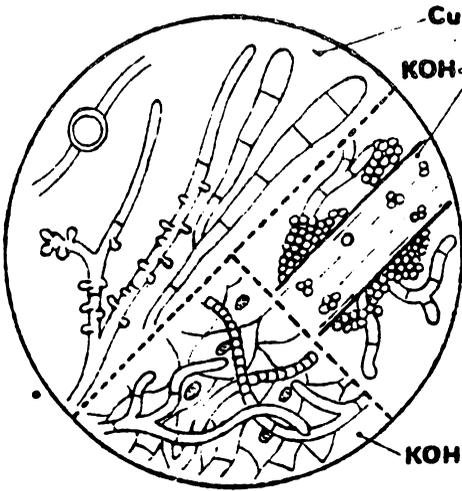


Fig. 3.14 Trichophyton rubrum.

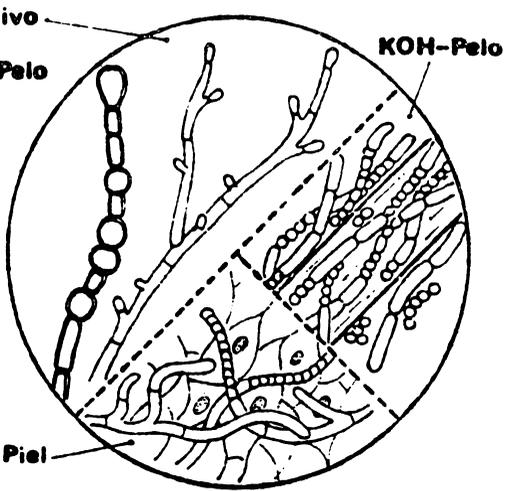


Fig. 3.15 Trichophyton tonsurans

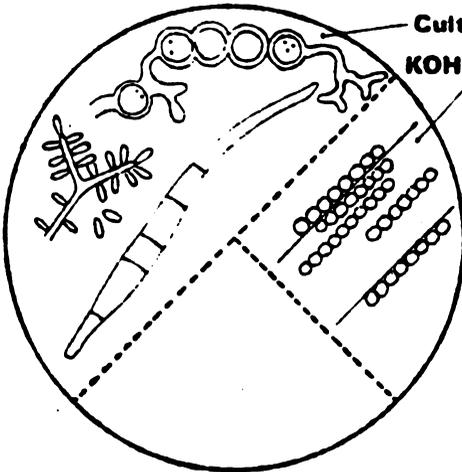


Fig. 3.16 Trichophyton verrucosum

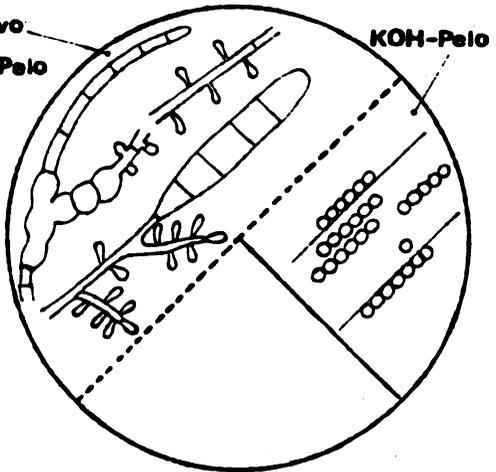


Fig. 3.17 Trichophyton equinum.

Cont. cuadro 3.4

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES DE KOH	
	Raspados de Piel	Pelo
<u>Trichophyton</u> <u>mentagrophytes</u>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3 - 5 μ) en la superficie del pelo (ectotrix). Micelio dentro del pelo (Ver Fig. 3.18).
<u>Trichophyton</u> <u>gallinae</u>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Las plumas no son afectadas. (Ver Fig. 3.19).

FUENTE: Jungerman y Schwartzman, 1977.
Beneke y Rogers, 1970.

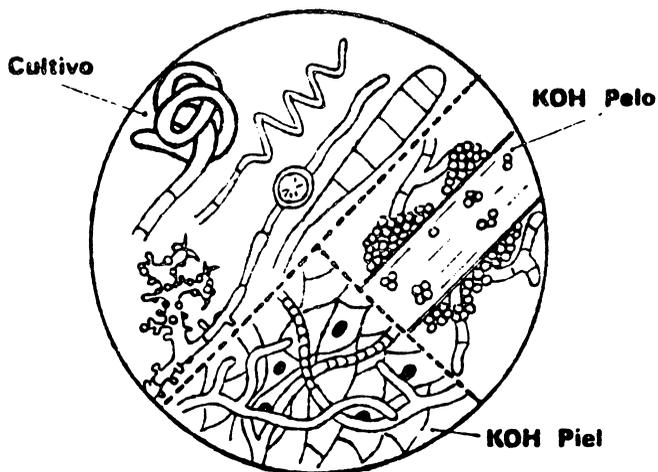


Fig. 3.18 T. mentagrophytes.

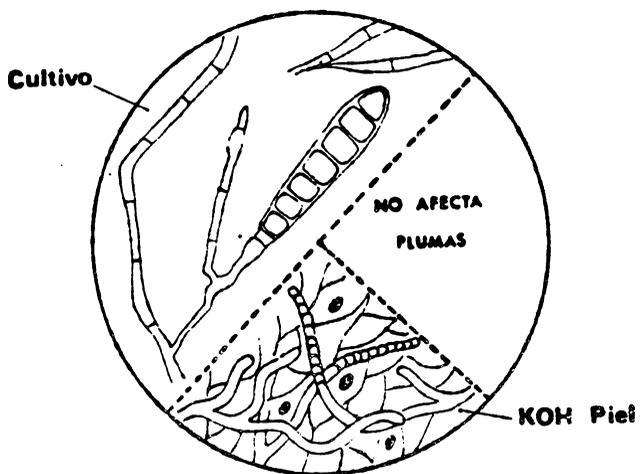


Fig. 3.19 Trichophyton gallinae

4. MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

Las micosis Inicialmente Tegumentarias, son un grupo de infecciones que generalmente se presentan en forma localizada, involucran a la piel y al tejido subcutáneo, y raramente se pueden diseminar a órganos internos.

Para Medicina Veterinaria, se consideran de importancia clínica: La Rinosporidiosis, la Esporotricosis, la Maduromicosis (Mycetoma), y la Candidosis.

Los agentes etiológicos de estas enfermedades se encuentran como saprófitos en la naturaleza, y la vía general de infección ocurre por la contaminación de heridas por el hongo⁶.

NOTA: Estas enfermedades las trataremos en forma de cuadros sinópticos para facilitar su comprensión.

Cuadro 3.5

Micosis Inicialmente Tegumentarias

ENFERMEDAD	DESCRIPCION:
Rinosporidiosis	<p>La Rinosporidiosis en los animales consiste en una rinitis poliposa crónica producida por el <u>Rhinosporidium seeberi</u>. La lesión consiste en un polipo, generalmente único y unilateral, pedunculado, adoptando en este caso un aspecto de coliflor. La enfermedad no es transmisible. Puede afectar a los equinos, bovino y caninos, así como al hombre³⁵.</p>
Esporotricosis	<p>Es una infección micótica de la piel y linfáticos cutáneos, provocada por el <u>Sporothrix schenckii</u>. La infección suele presentarse en las extremidades o el tronco, y toma una forma de nódulos subcutáneos o intradérmicos, de 1 a 4 cm. de diámetro. Los nódulos están formados por granulomas purulentos. Entre los animales la mayor parte de los casos descritos se refiere a los equinos^{28, 35}.</p>
Candidosis	Ver página 293

Cont. Cuadro 3.5

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
<p>Maduromicosis (Mycetoma)</p>	<p>El término Micetoma, se aplica a las tumefacciones, que ocurren por lo común en las extremidades. Los tumores son crónicos, la mayoría afectan la piel, tejido subcutáneo, fascia y huesos, y pueden contener abscesos y múltiples fístulas que drenan. Las especies de animales que más frecuentemente se ven afectadas son el caballo, el perro, el gato y los bovinos. En los animales los agentes etiológicos involucrados son el género <u>Helminthosporium spp.</u>, <u>Allescheria boydii</u>, <u>Curvularia geniculata</u>, <u>Ascomycetos</u>, y algunos <u>Deuteriomycetos</u>^{28, 36}.</p>
<p>Nocardiosis</p>	<p>La Nocardiosis ocurre como un proceso granulomatoso supurativo crónico que puede verse localizado en la piel y tejido subcutáneo o generalizado a -- partir de un foco primario, generalmente pulmonar. La enfermedad es común en perros y gatos. La infección se ha diagnosticado en mandíbulas equinas, y en los cerdos. Existen numerosos reportes de -- mastitis bovina causada por <u>Nocardia asteroides</u> 24, 28.</p>

Cuadro 3.6

Identificación de las Micosis Inicialmente Tegumentarias

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Sporothrix schenckii</u>	La fase parasitaria es una levadura, Gram (+) descrita a veces como "formas en puro" de 2 a 10 micras de longitud, demostrable en frotis de pus (Ver Fig. 3.20).	Como saprófito, el hongo toma una forma celular con hifas tabicadas de cerca de 2 micras de diámetro. En la extremidad de las ramificaciones se encuentran dispuestas en racimos, esporas ovales o piriformes, que semejan a "los pétalos de una flor" (Ver Fig. 3.20). 6.
<u>Rhinosporidium seeberti</u>	El agente puede ser demostrado mediante cortes histológicos o por medio de preparaciones húmedas de los pólipos. Entre el estroma puede verse el agente en forma de esférulas de distintos tamaños (Ver Fig. 3.21).	No se ha logrado el cultivo en forma artificial. 35.
<u>Candida albicans</u>	Ver página 295	Ver página 295

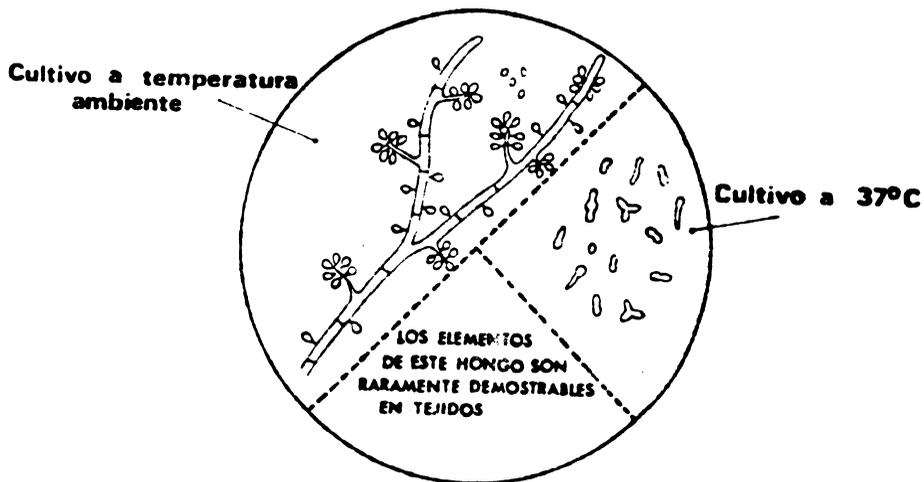


Fig. 3.20 Sporothrix schenckii

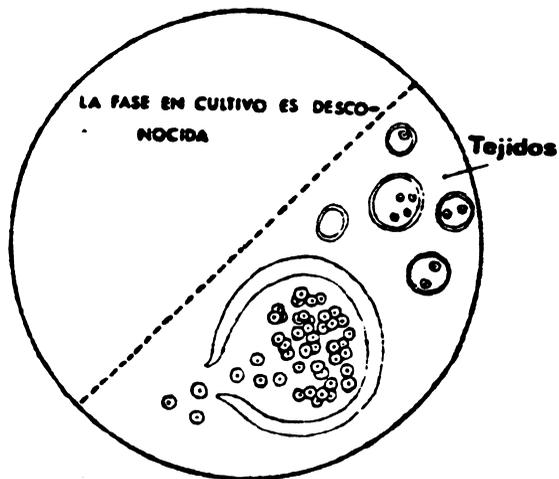


Fig. 3.21 Rhinosporidium seeberi.

(Cont. Cuadro 3.6)

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Nocardia asteroides</u>	<p>En Los tejidos y exudados, el microorganismo aparece como filamentos delgados (0.5 - 1.0 μ), ramificados y Gram (+). Es relativamente, ácido resistente y esta característica se demuestra mejor cuando se evita el empleo de alcohol en la tinción²⁴. (Ver Fig. 3.22).</p>	<p>Las especies de <u>Nocardia</u> crecen bien en condiciones aerobias, - sobre muchos medios de cultivo simples. Las colonias son cerasas con pigmentación que varía de amarilla a naranja o rojiza. Las hifas blancas aéreas se forman sobre la superficie de la colonia. La esporulación ocurre por fragmentación en artrosporas. (Ver Fig. 3.22). 34.</p>
<u>Allescheria boydii</u>	<p>El examen microscópico revela una proliferación granulomatosa eosinófila de la submucosa y mucosa basal, células de Langhans, y clamidosporas de pared delgada con hifas segmentadas. En las muestras de pus y exudados pueden observarse colonias pigmentadas como puntos color marrón o negro. (Ver Fig. 3.23) 36.</p>	<p>Produce un micelio aéreo blanco algodonoso. Al microscopio se observa un micelio septado, moderadamente ancho. Conidias unicelulares, ovals o en forma de para (6 - 9 μ) (Ver Fig. 3.23). 24.</p>

Cont.

(Cont. Cuadro 3.6)

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Helminthosporium ssp.</u>	Igual al anterior.	<p>Crece formando una colonia de color gris, la cual presenta una área central deprimida de color negro. Al microscopio, el micelio conidioforo y conidias son de color café oscuro. El conidioforo se desarrolla como una rama del micelio y se ensancha en la terminal y puede aparecer anudado o torcido. Las conidias tienen una semejanza notable con los huevecillos segmentados de los helmintos (Ver Fig. 3.24). 4.</p>
<u>Curvularia geniculata</u>	Igual a <u>A. boydii</u>	<p>El micelio aéreo es blanco algodonoso que torna a gris, café y finalmente negro. Al microscopio se observan conidioforos fusiformes, abundantes de color café oscuro, tienen 3 - 4 tabiques y una tendencia a curvarse ligeramente. (Ver Fig. 3.25) 4.</p>

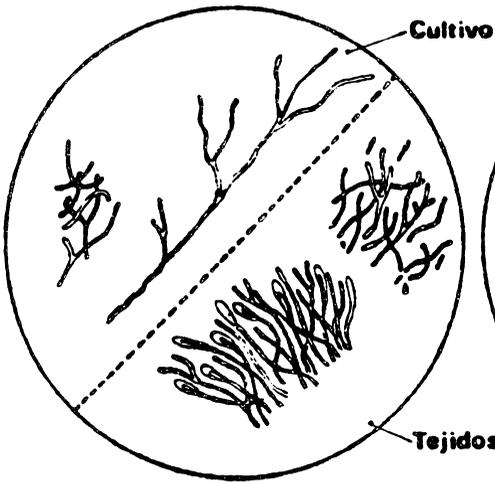


Fig. 3.22 Nocardia asteroides

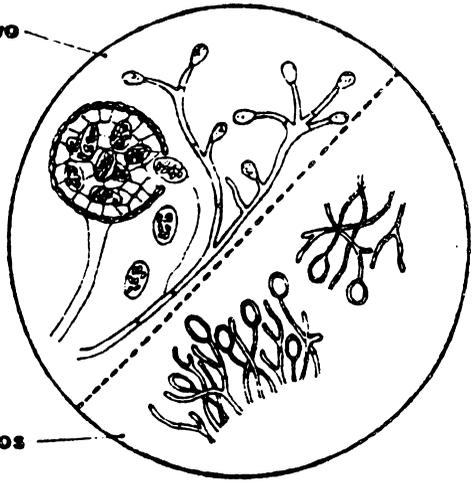


Fig. 3.23 Allescheria boydii

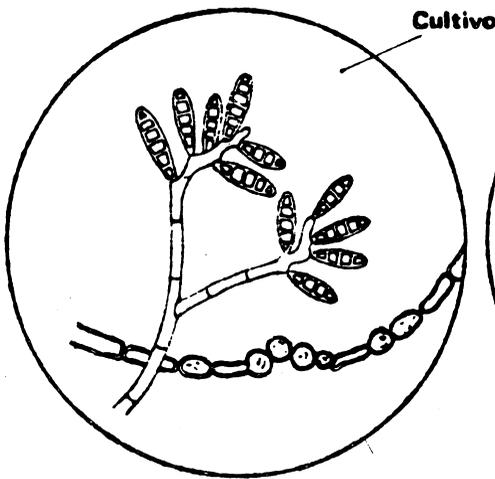


Fig. 3.24 Helmintosporium Spp.

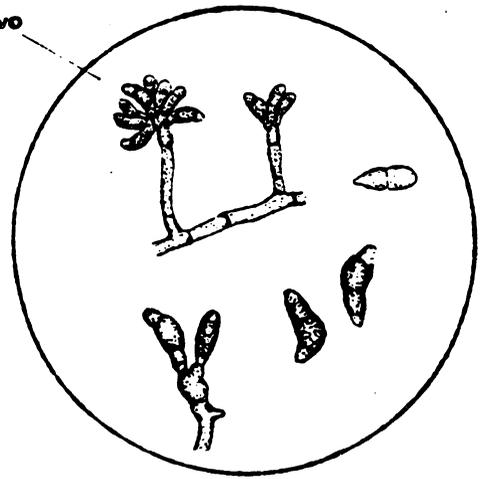


Fig. 3.25 Curvularia geniculata

5. MICOSIS SECUNDARIAMENTE TEGUMENTARIAS (Micosis Sistémicas)

Las Micosis Sistémicas son aquellas que involucran a los órganos internos y en algunos casos pueden verse afectados la piel, el tejido subcutáneo, y los huesos.

En muchos de los casos las micosis sistémicas pueden cursar asintomáticamente, y sólo pueden ser reconocidas mediante procedimientos inmunológicos. En la forma progresiva de las enfermedades los síntomas son pronunciados, y los órganos internos pueden encontrarse seriamente lesionadas, y llegar a producir la muerte si no se ha realizado un tratamiento oportuno¹.

NOTA: La forma de exposición de estas enfermedades, es similar a la utilizada para las Micosis Inicialmente Tegumentarias.

Cuadro 3.7

Micosis Secundariamente Tegumentarias (Micosis Sistémicas)

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
Coccidioidomicosis	La Coccidioidomicosis ocurre como un infección respiratoria primaria, provocada por el <u>Coccidioides immitis</u> . La mayor parte de las infecciones respiratorias son benignas y no progresivas. Cuando la infección llega a deseminarse, forma lo que se conoce como "granuloma coccidial". En los animales se observa la forma generalizada en perros, caballos y ovejas. La enfermedad es muy común en los bovinos y los cerdos, limitada exclusivamente a las vísceras torácicas 35.
Histoplasmosis	Es una infección micótica que primariamente invade el sistema retículo endotelial del hombre y a los animales, provocada por el <u>Histoplasma capsulatum</u> . La enfermedad puede ser aguda, subaguda o crónica; localizada o generalizada. Las lesiones primarias suelen localizarse en las cavidades bucofaríngeas e intestinal. La infección generalizada resulta siempre progresiva y mortal. De los animales domésticos, el perro, es el más afectado 28.

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
Blastomicosis Norteamericana	<p>Es una infección de presentación local o generalizada, del hombre y los animales. <u>Blastomyces dermatitidis</u>, un hongo dimórfico, es el responsable de la infección. El síndrome usual es el de una enfermedad crónica, con trastornos respiratorios terminales y muchos otros signos dependientes de la topografía de diseminación, se observa cojera de una o más extremidades. Las manifestaciones clínicas pueden ser exclusivamente cutáneas, afectando la piel, ojos, glándulas mamarias y ganglios linfáticos superficiales_{1, 35}.</p>
Blastomicosis Sudamericana	<p>Es una enfermedad micótica crónica que asemeja a la Coccidioidomicosis y a la Blastomicosis norteamericana, provocada por el <u>Paracoccidioides braziliensis</u>. La enfermedad puede manifestarse de forma mucocutánea (lesionando los labios, nariz y mucosa oral); en la forma linfagítica (que se inicia en la boca y se extiende a los linfáticos del cuello); o en la forma generalizada, que afecta el tracto digestivo₁.</p>
Candidosis	Ver página 295

Cont.

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
Criptococosis	<p>Es una micosis subaguda o crónica, provocada por el <u>Cryptococcus neoformans</u>. La enfermedad puede ser local o generalizada, aunque demuestra una marcada predilección por el sistema nervioso central en el hombre, perro y otras especies. La infección puede ser cutánea, manifestándose en forma de nódulos ulcerativos. En la cavidad nasal las lesiones aparecen en forma de polipos mixomatosos₃₅.</p>
Actinomicosis	<p>Es una infección específica que afecta a la mayoría de los animales domésticos. La lesión clásica provocada por el <u>Actinomyces bovis</u>, es la "quijada nodosa" de los bovinos, ésta y algunas otras lesiones se han estudiado en el hombre. En los cerdos el paratuberculosis afecta la glándula mamaria, provocando mastitis; en los caballos el único tipo de Actinomicosis se da en el llamado "Mal de la Cruz". En los perros y gatos, la enfermedad, presenta un curso más virulento y las lesiones recuerdan la infección provocada por <u>Nocardia</u>₃₆.</p>
Aspergilosis	Ver página 303

Cuadro 3. 8

Identificación de las Micosis Sistémicas

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Coccidioides immitis</u>	El hongo es dimórfico. En los tejidos su forma característica es una - esférula o esporangio - de 5 a 50µ de diámetro provisto de una doble - pared gruesa (Ver Fig. 3.26).	En el crecimiento micelial, se observan hifas que en su parte terminal presentan artrosporas de paredes gruesas, las cuales son altamente contagiosas (infectantes) (Ver Fig. 3.26) _{28.}
<u>Histoplasma capsulatum</u>	En los tejidos, el parásito se localiza intracelularmente en las células del S.R.E., y las levaduras tienen de 2 - a 4 micras de diámetro, cuando se tiñen con H.E. (Ver Fig. 3.27).	Produce un abundante micelio en cultivo. Este produce dos tipos de esporas, un microconidio pequeño, liso y globoso, y un macroconidio o clamidospora grande de paredes gruesas _{35.} (Ver Fig. 3.27).
<u>Candida albicans</u>	Ver página 295	Ver página 295

Cont.

Cont. Cuadro 3.8

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Blastomyces dermatitidis</u>	A 37° C, el hongo se hace similar a una levadura de 5 a 15 μ de diámetro, con una doble pared gruesa, se reproduce por gemación, siendo esta la forma que se observa en el material clínico. (Ver Fig. 3.28).	En cultivo a 27° C, produce un profuso crecimiento micelial. El examen microscópico revela hifas tabicadas, a lo largo de los lados de las hifas y en los extremos de las ramas cortas laterales (conidioforos), se aprecian conidias características de paredes lisas ₁ . (Ver Fig. 3 28).
<u>Para-coccidioides braziliensis</u>	La fase levaduriforme -- que se observa en el exudado y los tejidos infectados, así como en los cultivos mantenidos a -- 37° C, se caracteriza por la presencia de células gemadas (4.5 - 9 micras), con gemas múltiples. El hallazgo de las formas gemadas múltiples, en los tejidos, sirve para diferenciar <u>P. braziliensis</u> de <u>B. dermatitidis</u> ₂₄ . (Ver Fig. 3.31).	Análogo a <u>B. dermatitidis</u>

Cont.

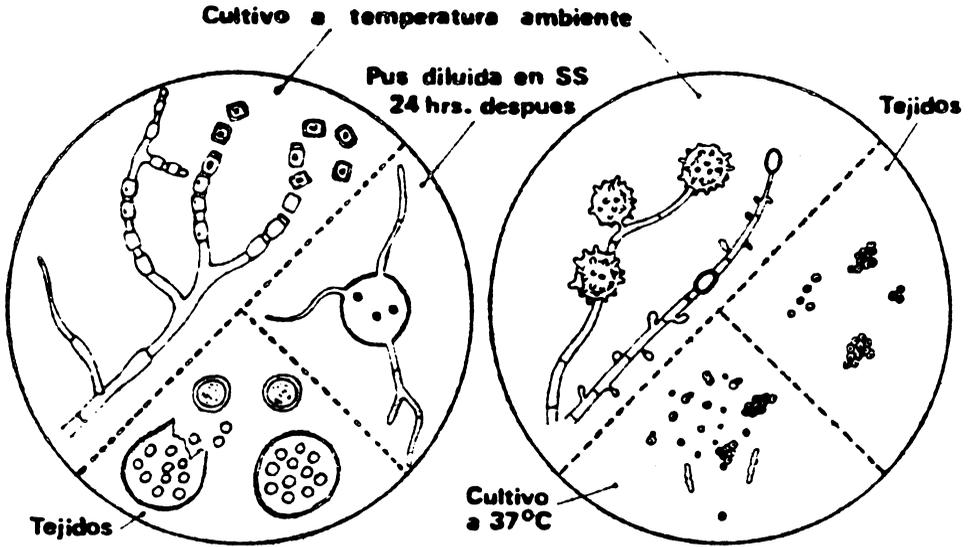


Fig. 3.26 Coccidioides immitis

Fig. 3.27 Histoplasma capsulatum

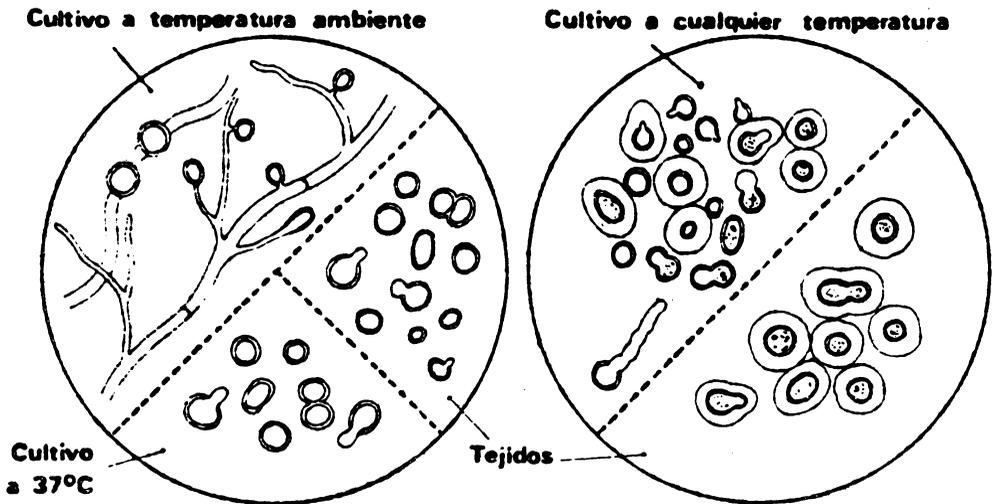


Fig. 3.28 Blastomyces dermatitidis

Fig. 3.29 Cryptococcus neoformans

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Cryptococcus neoformans</u>	<p>El hongo es monofásico, en forma de levadura, rodeada por una amplia cápsula compuesta de mucopolisacáridos, la cual puede evidenciarse en las muestras de L.C.R. leche, orina y otros líquidos corporales, extendidas en una gota de tinta china o nigrosina, observándose como un halo grande transparente. En el tejido, el agente se demuestra mediante la tinción de P.A.S., Azul alción, y por la técnica de plata de Gomori, donde se observan levaduras de 5 a 20 micras de diámetro (Ver Fig. 3.29).</p>	<p>En cultivo, el agente forma colonias lisas, mucoides de color crema o café, cuando se incuban a 20 y a 37° C. Microscópicamente se pueden observar células en gemación, características, con paredes gruesas. El hongo crece en la mayoría de los medios ordinarios de laboratorio.³⁶ (Ver Fig. 3.29).</p>
<u>Actinomyces bovis</u>	<p>El agente se puede demostrar en los frotis de los gránulos provenientes de pus, y de las estrias de sangre, y de los fragmentos de tejido, utilizando la tinción de Gram y el método de Kinyoun en frío (empleando H₂SO₄ al 1% para la decoloración). El agente aparece como Filamentos ramificados y pleomórficos de tamaño bacilar (Ver Fig. 3.30)</p>	<p>Las especies de <u>Actinomyces</u> spp son microaerófilas a anaerobias. Los medios pueden incubarse en cualquier sistema anaeróbico. <u>A.bovis</u>, forma colonias en "gotas de rocío", convexas. Las características morfológicas resaltan de la cantidad de filamento producido.³⁶ (Ver Fig. 3.30).</p>

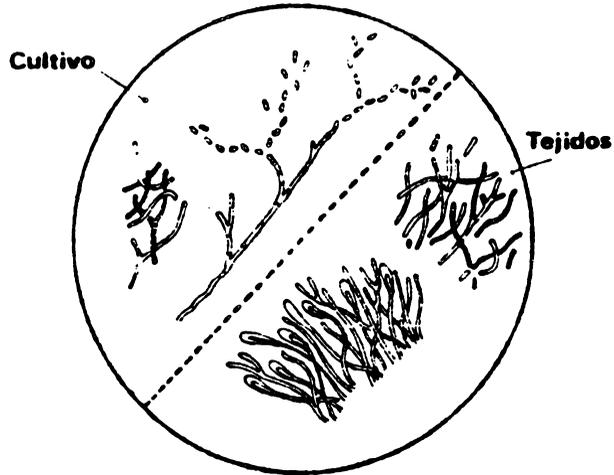


Fig. 3.30 Actinomyces bovis

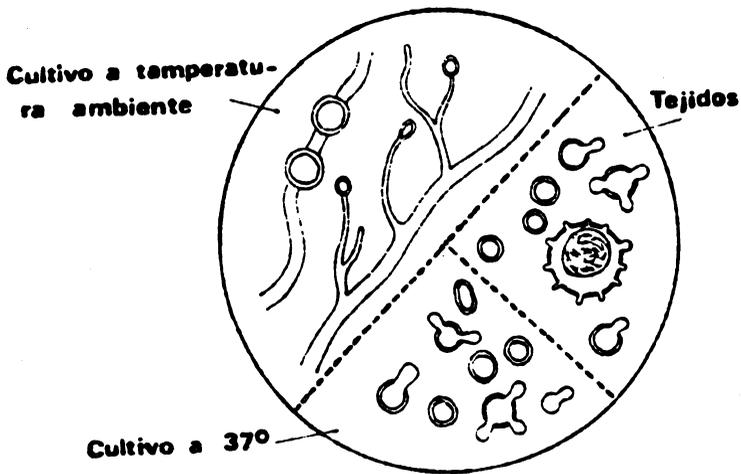


Fig. 3.31 Paracoccidioides braziliensis.

6. CANDIDOSIS

La Candidosis (Moniliasis), es causada por un hongo parecido a levadura, conocido como Candida Spp. El hongo se encuentra frecuentemente como saprófito inerte -- alojado en el tracto digestivo, respiratorio, y en la piel del hombre y de los -- animales domésticos, las especies involucradas y reportadas más frecuentemente, - en medicina humana y veterinaria, son C. albicans y el C. tropicalis³⁶.

La presentación de la infección por este agente, comprende una serie de factores predisponentes, los cuales podemos agrupar de la siguiente forma:

	Terapia con citostáticos
	Antibioterapia prolongada
<u>Causas Iatrogénicas</u>	Corticoterapia
	Radioterapia (sobre todo en humanos).
	pH
<u>Factores</u>	Humedad excesiva
<u>Físico-Químicos</u>	Daño mecánico

Gestación

Factores Parto (nacimientos prematuros)

Fisiológicos Infancia

Obesidad

Diabetes mellitus

Factores Cáncer

Patológicos Discracias sanguíneas

Deficiencias inmunológicas

La Candidosis aparentemente no tiene limitaciones geográficas, Candida Spp., está presente en el hombre, y animales, donde quiera que residan y sólo requieren la - condición inductiva para hacerse manifiesta clínicamente. Los casos animales y en particular los de las aves, y los bovinos, son sin duda más frecuentes que los que indican las estadísticas⁴⁵.

6.1 DATOS CLINICOS

Debido a los diversos factores predisponentes y condiciones patológicas relacionadas, los signos clínicos de la Candidosis en los animales domésticos no son específicos, los aspectos Veterinarios de esta enfermedad, los podemos resumir de la siguiente manera:³⁶

En las aves (pollos, palomas, pavos y perdices) son muy frecuentes y bastante graves las lesiones parecidas al algodoncillo de los niños (crup), invaden la boca, el buche, el proventrículo, la molleja, y los intestinos, estas lesiones se carac

terizan por la aparición de puntos o placas blanquecinas de forma circular o alargada sobre la parte superior de los pliegues de la mucosa descritas como parecidas a una "toalla turca" o a un "coágulo". Los pollos afectados muestran crecimiento retardado adoptando el clásico síndrome del "pollo achaparrado".

Especies de Candida (sobre todo, albicans), han sido la causa de enfermedad generalizada en bovinos, y se han aislado en casos de mastitis agudas, además, se ha demostrado el agente en la ocurrencia de neumonías crónicas, exudados vaginales patológicos, abortos e inflamaciones específicas de esófago²⁸.

La Candidosis en el cerdo ha sido reportada con mayor frecuencia en los lechones, donde la infección oral, cursa con una elevada mortalidad. Las lesiones en el tracto digestivo de los animales en engorda, se caracterizan por la presentación de úlceras gástricas, y la afección de la mucosa oral y esofágica, también, se ha observado la candidiasis cutánea en esta especie.

En el perro y en el gato, la Candidosis, se presenta como una dermatosis micótica, y esta generalmente relacionada con procesos patológicos y con antibioterapia prolongada. Se han reportado infecciones genitales, en el perro, provocando vaginitis y balanopostitis.

La Candidosis equina es muy rara y aparentemente sólo ha sido descrita como una infección secundaria.

6.2 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la Candidosis requiere más que un aislamiento e identificación

de las especies de Candida Spp., y un diagnóstico de esta enfermedad nunca debe aparecer en un informe de laboratorio, el papel del laboratorio, se reduce exclusivamente, a identificar un patógeno potencial; la interpretación y el diagnóstico final, deben de ser reservados al clínico³⁶.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Los raspados de piel y mucosas son examinados en preparaciones con KOH al 10%. Los raspados de mucosa pueden ser extendidos en un portaobjetos y teñirse con -- Gram, o preparaciones directas pueden trabajarse con Azul de Algodón de Lactofenol, el examen microscópico de estos frotis, puede mostrar la presencia de células redondas u ovals en gemación de 3 a 6 micras de diámetro (Blastosporas), y fragmentos de micelios (pseudomicelios), o micelios verdaderos en abundancia --- (Ver Fig. Fig. 3.32), si se observan estas tres estructuras características, es indicativo generalmente, de la invasión de los tejidos por especies de Candida⁵⁰.

NOTA: El examen directo de muestras provenientes de focos inflamatorios cerrados, líquidos corporales normalmente estériles (líquido pleural, L.C.R., y sangre), o de orina recolectada en forma estéril, que demuestre la presencia de Candida, aún en número reducido, es patológico.

IDENTIFICACION DEL GENERO CANDIDA

MATERIAL CLINICO

(Hisopos, Raspado Cutáneo y Mucocutáneo, Sangre)

DEMOSTRACION

Examen en Fresco (KOH)

Tinción de Gram

Tinción de P.A.S.

AISLAMIENTO

Agar E.M.B.

Agar para Staphylococcus 110

Agar Sangre

Agar Mycosel o S.D.A.

DETERMINACION DE ESPECIE

Prueba del Tubo Germinativo

Producción de Clamidosporas

Zimograma (Fermentación de Azúcares)

Auxonograma (Asimilación de Azúcares)

CULTIVO (Aislamiento)

Se deben inocular medios selectivos para lograr el aislamiento primario de Candida Spp. ya que la mayoría de las muestras se obtienen de sitios normalmente habitados por bacterias, es recomendable inocular medios como el agar eosina azul de metileno el agar para Staphylococcus 110, agar chocolate, el agar sangre (incubado a 37° C y a 27 - 28° C por 48 a 72 horas), y el agar Micosel o agar dextrosa Sabouraud (SDA) incubado a 37° C por 4 a 5 días.

En el agar S.D.A., las colonias jóvenes de Candida albicans son blancas, blandas y generalmente lisas; las colonias viejas presentan un crecimiento micelial sumergido en los márgenes dando la apariencia plumosa característica. El examen microscópico demuestra células ovales, redondas y en gemación. En los cultivos viejos pueden ser observados pseudomicelios y en ocasiones micelios verdaderos³⁶. (Ver Fig. 3.32).

PRUEBA DEL TUBO GERMINATIVO

La prueba del tubo germinativo (Prueba de Filamentación), descrita por Taschdjian y Cols., 1960., es un método rápido utilizado para la identificación de Candida albicans, se basa en la producción de crecimientos periféricos por las células de C. albicans (pseudogermen) cuando se inoculan en 0.5 ml. de suero humano o suero fetal bovino, y se incuban a 37° C por 3 horas, esta prueba ofrece grandes ventajas, es rápida, simple y muy específica y no requiere el empleo de cultivos puros. La producción de tubos germinativos, distingue a Candida albicans, de otras formas de levaduras^{13, 50 14}. (Ver Fig. 3.33).

NOTA: Una modificación empleando clara de huevo, en lugar del suero, fué descri-

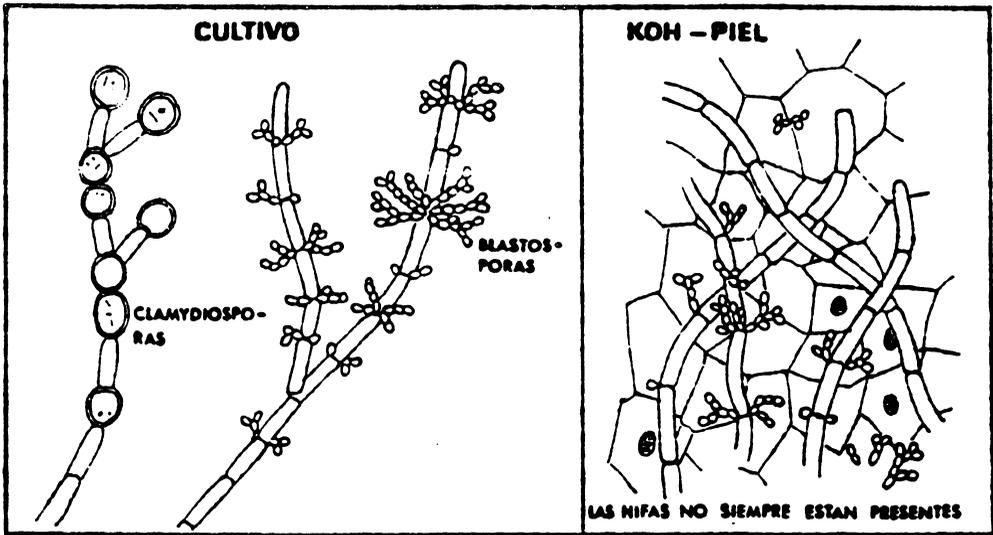


Fig. 3.32 Aspecto de Candida albicans en cultivo y en examen directo

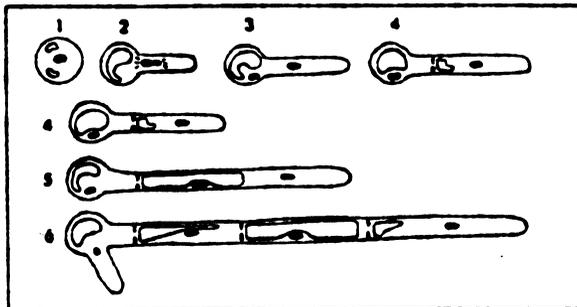


Fig. 3.33 Secuencia en el desarrollo del tubo germinativo en Candida albicans.

ta por Buckley y Van Uden en 1963; otro método utiliza líquido amniótico bovino con la misma finalidad, la ventaja de este último, es que la filamentación ocurre en un lapso de 30 minutos^{14, 27}.

PRODUCCIÓN DE CLAMIDOSPORAS

La producción de Clamidosporas (conidios) por C. albicans constituye una prueba diferencial importante; éstas pueden ser producidas en el agar Harina de Maíz, o en el medio Gzapek Dox, suplementados con carne o con Tween 80 al 1%. El medio se inocula en ángulo de 45° con un alambre recto, parte del área inoculada deberá ser cubierta con un cubreobjetos estéril, las cajas se incuban a 37° C por 24 horas y, si un crecimiento no es característico, se reincuban por 2 a 3 días más. Deben evitarse los errores de interpretación, debidos a la rara producción de Clamidosporas, similares, aunque morfológicamente diferentes de otras especies de Candida, especialmente C. guilliermondi y C. stellatoidea³⁶.

ZIMOGRAMA Y AUXONOGRAMA

A causa de la simplicidad y especificidad de la prueba del suero en tubo y de la producción de Clamidosporas, Candida albicans puede ser rápidamente identificada con certeza mediante una combinación de las dos pruebas; la confirmación puede ser obtenida mediante las pruebas de Fermentación y Asimilación de azúcares (Ver cuadro 3.9 y 3.10).

NOTA: En la realización de las pruebas de Fermentación y Asimilación de azúcares, es indispensable contar con cultivos puros. En el caso del Zimograma (Fermentación), el medio de prueba puede ser sellado con vaselina fundida, o -

Cuadro 3.9

Reacciones de Fermentación de Azúcares por Candida

(Zimograma)

E S P E C I E	Crecimiento en pH ácido	Cárbhidratos (21 - 27°C)			
		D +	M	S	L
<i>C. albicans</i>	+	Ag	Ag	A	O
<i>C. stellatoidea</i>	-	Ag	Ag	A o O	O
<i>C. tropicalis</i>	-	Ag	Ag	Ag	O
<i>C. guilliermondi</i>	-	A o Ag	O	A o Ag	O
<i>C. parapsilosis</i>	-	Ag	O	A o O	O
<i>C. Pesudotropicalis</i>	-	Ag	O	Ag	Ag
<i>C. Krusei</i>	-	Ag	O	O	O

FUENTE: Jungerman, P.; Schwartzman, R., 1977. y Hazen, E.; Gordon, M., 1970.

+ : D= Dextrosa M = Maltosa S= Sacarosa L= Lactosa

++ : A= Sólo Acido; Ag= Acido y Gas.

Cuadro 3. 10

Características diferenciales de *Candida* en base a la asimilación de azúcares* (Auxonograma).

E S P E C I E	Acción sobre los Carbohidratos (21 - 27 °C)						
	Glu. [®]	Gal.	Lac.	Mal.	Raf.	Sac.	Cel.
<i>C. albicans</i>	+	+	0	+	0	+	0
<i>C. guilliermondi</i>	+	+	0	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	0	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	0	+	0	+	0
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	+	+	0	+	+	0 0 +
<i>C. stellatoidea</i>	+	+	0	+	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	+	+	0	+	0	+	0 0 0

*FUENTE: Jungerman, P.; Schwartzman, R., 1977. y Hazen, E.; Morris, G. 1970.

®: Glu.= Glucosa Gal.=Galactosa Mal.= Maltosa Raf.= Rafinosa Sac.= Sacarosa Cel.= Celobiosa La.= Lactosa.

bien, llevar incluido un tubo invertido de Durham para demostrar la producción de gas, los tubos se incuban a 37° C, durante 10 días³⁶.

7. ASPERGILOSIS

La Aspergilosis, ampliamente difundida, comprende un grupo de micosis con causas diversas y patogénesis distinta, los hongos del género Aspergillus son ubicuos, y de las numerosas especies que se conocen, una de ellas, el Aspergillus fumigatus, produce la mayor parte de infecciones en mamíferos, aves y hombre, aunque hay otras especies, como el A. flavus, el A. niger y el A. nidulans, que pueden actuar también como patógenos ocasionales^{34, 35}.

La enfermedad es relativamente rara en los animales domésticos y en los animales de compañía, pero ocurre, con frecuencia en las aves y los bovinos. La Aspergilosis demostrada por la detección de los organismos en las lesiones, es considerada como una infección respiratoria primaria, iniciada por la inhalación de esporas; o bien, como una infección placentaria, en la cual, se encuentra involucrado el feto y utero gestante³⁶.

Los Aspergillus están presentes como saprófitos en la mayoría de los climas, y las principales fuentes de contaminación las constituyen los alimentos y camas en mohecidos, especialmente el heno y los granos que, por una excesiva humedad, favorecen la proliferación del hongo, estos hongos producen sustancias venenosas denominadas Micotoxinas, principalmente A. flavus y A. fumigatus, estas sustancias son altamente tóxicas (al igual que carcinogénicas) para los animales y el hombre^{28, 34}.

Ocasionalmente puede ocurrir metástasis de la infección hacia otros tejidos (entre los que se cuentan las meninges), y al riñón, el cual es uno de los más afectados.

7.1 DATOS CLINICOS

Los signos clínicos que han sido descritos en las aves, y en los bovinos, comprenden:

En las aves, la Aspergilosis, se presenta (en la mayoría de las ocasiones) en forma epizóptica, en cuyo caso las pérdidas económicas son considerables, a diferencia de la mayoría de los otros hongos productores de micosis profundas, éste ataca con mayor frecuencia a las aves jóvenes que a las adultas; en la forma aguda (neumonía de criadora), la infección cursa con problemas respiratorios marcados, en algunos casos el hongo invade el cerebro y causa parálisis y otros signos de afección del SNC, las afecciones oculares son comunes³⁶.

En los bovinos, se han observado varias formas de Aspergilosis; para Medicina Veterinaria, es importante hacer mención al denominado "Aborto Micótico" bovino provocado por la invasión oportunista de los géneros Aspergillus, Absidia, Mucor y Rhizopus, con la excepción de los Rhizopus, estos microorganismos son patógenos secundarios bien conocidos. El aborto se presenta en la gestación avanzada, entre el sexto y el octavo mes; el feto abortado rara vez está vivo, y la retención placentaria ocurre en aproximadamente un 60% de los casos, el feto puede aparecer normal, pero con frecuencia muestra lesiones cutáneas características en forma de placas elevadas irregulares semejantes a la ictiosis o a la tiña difusa^{28, 35}.

Son raros los casos auténticos de Aspergilosis en las demás especies domésticas; existen reportes de que la ingestión de alimentos enmohecidos, sobre todo si están contaminados por A. fumigatus y A. flavus, pueden producir una enfermedad -- mortal en los cerdos y ganado vacuno, que se manifiesta por hemorragias internas. Se ha reportado la Aspergilosis pulmonar fatal en gatos. Los aislamientos del agente, en perros, se han realizado de infecciones nasales y en infecciones mixtas de la oreja.

Las lesiones producidas por las Micotoxinas (aflatoxinas), son muy variadas, graves y en muchas ocasiones mortales, estas lesiones, son las mismas que se observan en el llamado "Síndrome Hemorrágico" y se caracterizan por la presencia de fragilidad capilar y hemorragias generalizadas; la hepatotoxicosis, es común en presencia de aflatoxinas; la Citrinina, presenta un marcado efecto nefrotóxico, y la Zearalenona, esta involucrada con la ocurrencia de abortos^{28, 34}.

7.2 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la Aspergilosis requiere de un cuidadoso enfoque, los Aspergillus constituyen los hongos contaminantes más comunes en el laboratorio y rutinariamente pueden ser cultivados de la piel y del tracto respiratorio superior de los animales sanos; es evidencia presuntiva de Aspergilosis el aislamiento repetido de una especie de Aspergillus del material clínico en ausencia de otros agentes patógenos³⁶.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Las preparaciones húmedas pueden examinarse directamente. El material clínico -

(raspados) se obtiene con facilidad de las vías aéreas, durante la necropsia de las aves afectadas. Los raspados cutáneos del feto, y las muestras de líquido abomasal, lo mismo que las muestras de placenta, pueden ser teñidos por el método de Gram, o bien, puede emplearse Azul de Algodón de Lactofenol. El examen microscópico demuestra un micelio de 4 a 6 micras de ancho, es tabicado y de un diámetro regularmente uniforme, aunque no es posible (a menos que una cabeza conidial esté presente) distinguir este micelio de otros eumicetos hialinos, la presencia de grandes cantidades del mismo es sugestiva de Aspergilosis³⁶. (Ver Fig. 3.34).

CULTIVO (Aislamiento).

El Aspergillus fumigatus y el Aspergillus flavus, así como otras especies de Aspergillus crecen bien en el agar dextrosa Sabouraud, los antibióticos antibacterianos pueden ser utilizados en el medio, pero no deberá emplearse la cicloheximida ya que la mayor parte de los Aspergillus son sensibles a este antibiótico.

Las colonias de Aspergillus fumigatus son planas, al principio son blancas y ligeramente vellosas, posteriormente las conidias toman un color verde azulado oscuro y un aspecto pulverulento. Los cultivos viejos tienen una apariencia gris "ahumada", la cual es muy característica.

El examen microscópico muestra una vesícula de forma parecida a la de un matraz invertido con un fondo redondeado y un cuello alargado. Una fila de esterigmata está situada en la mitad superior de la vesícula, en una formación más o menos paralela (aglomerada), las conidias son esféricas, verdes y de superficie rugosa, las cadenas de las conidias que se desprenden de la esterigmata son más o menos paralelas, esto da una apariencia columnar o de bandera a las cabezas (Ver Fig. 3.35-B).

Las colonias de Aspergillus flavus crecen y se extienden rápidamente en los medios ordinarios, el color de las áreas conidiales varía del verde amarillento - claro al oscuro, la coloración verde puede desaparecer en los cultivos viejos - resultando una apariencia de la superficie de color amarillo o café amarillento.

Al examen microscópico, pueden observarse conidióforos de 400 a 1000 micras de por 5 a 10 micras de diámetro, las paredes del conidióforo pueden estar excavadas, rugosas y en ocasiones espinosas en apariencia. La esterigmata está dispuesta ya sea en una serie simple o en series simples o dobles en la misma vesícula, las conidias son de 3 a 5 micras de diámetro, piriformes o redondas, excavadas y equinuladas, pueden variar de casi incoloras a verde amarillentas²⁴, 30, 36. (Ver Fig. 3.35-A).

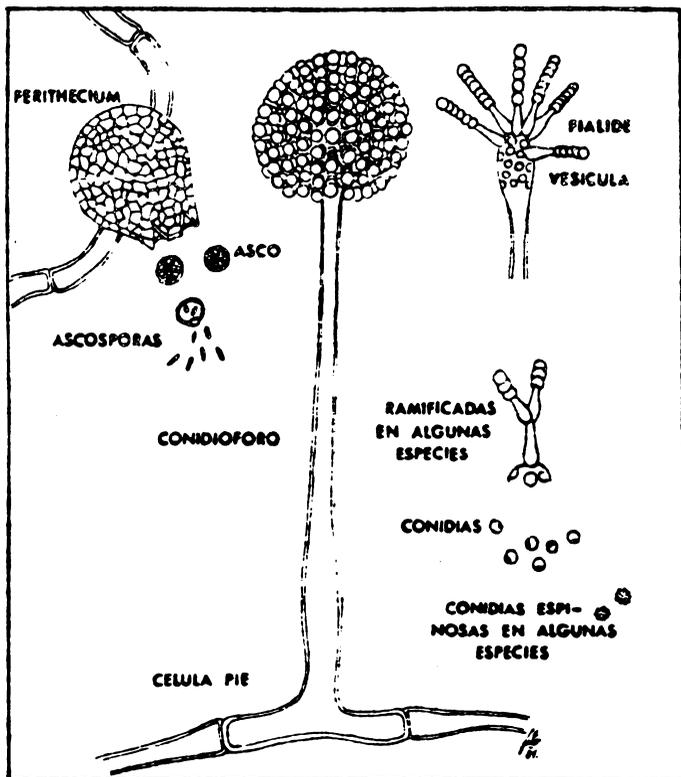


Fig. 3.34 Características morfológicas de Aspergillus Spp.

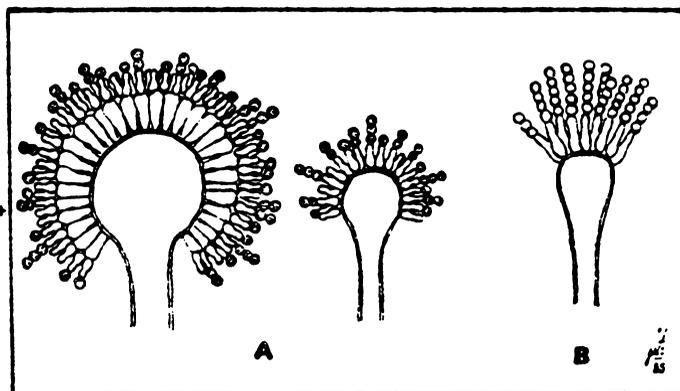


Fig. 3.35 (A) Aspergillus flavus. (B) Aspergillus fumigatus.

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. Ajello, L.; Georg, K.L.; Kaplan, W.; Kaufman, L. (1975). Laboratory Manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service.
2. Alba, F.J.; Garza, G. D.; Martínez, C. E.; Osorio, F. M.; Ruíz, R. A.; Sandoval, C. Ma. A.; Tovar, T. C.; Trujillo, G. A. (1982). Manual de Micología Médica. 3a. edición. I.P.N. Departamento de Micología. México.
3. Alexopoulos, C. J. (1966). Introducción a la Micología. 1a. edición. E.U.D.E.B.A. Argentina.
4. Barnett, H. L. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
5. Bauer, J. D.; Ackerman, G.P. (1974). Clinical Laboratory Methods. Eighth Edition. The C.U. Mosby Company. U.S.A.
6. Beneke, E. S.; Rogers, A.L. (1970). Medical Mycology Manual. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. U.S.A.
7. Bennington, F. H. (1976). El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. 1a. ed. La Prensa Médica Mexicana. México.
8. Bioxon de México, S. A. de C. V. (1984). Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. Editado por Bioxon de México. México.
9. Boyd, R.; Marr, J. (1980). Medical Microbiology. First Edition. Little, Brown and Company. U.S.A.
10. Bradshaw, L. J. (1976). Microbiología de Laboratorio. 1a. edición. El Manual Moderno. México.
11. Branson, D. (1972). Methods in Clinical Bacteriology: A Manual of Test and Procedures. Publication Number 840. Charles C. Thomas Publisher. U.S.A.
12. Bryant, M. C. (1976). Antibióticos y su Control mediante el Laboratorio. 1a. edición. El Manual Moderno. México.

13. Buttiaux, R.; Beerens, H.; Tacquet, A. (1969). Manual de Techniques Bacteriologiques. Third Edition. Editions Medicales Flammarion.
14. Campbell, C. M.; Stewart, J. L. (1980). The Medical Mycology Handbook. A Wiley Medical Publication. John Wiley and Sons. New York. U.S.A.
15. Carpenter, L.P. (1979). Microbiología. 4a. edición. Ed. Interamericana. México.
16. Carter, G. R. (1969). Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias. 1a. edición. Edit. Acribia. España.
17. Coffin, L. D. (1977). Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 2a. reimpresión. La Prensa Médica Mexicana. México.
18. Cowan, S. T.; Steel, K. J. (1979). Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 1a. edición. Compañía Editorial Continental, S. A. México.
19. Davidsohn, I.; Bernard, J. (1983). Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. edición. Salvat Editores.
20. Deacon, J. W. (1980). Introduction to Modern Mycology. Basic Microbiology. Volume 7. First Published. Blackwell Scientific Publications. London and Edinburg.
21. Dirección General de Información y Relaciones Públicas de la S.A.R.H. y la Dirección General de R.T.C. de la Secretaría de Gobernación. (1984). Envío de Muestras a Laboratorios Veterinarios. Editorial Talleres Gráficos de la Nación (Texto). México.
22. Dirección General de Investigación en Salud Pública. (1979). Comité Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos. Laboratorio Nacional de Salubridad. México.
23. Dirección General de Sanidad Animal. Subdirección de Epizootiología. Departamento de Diagnóstico S. A. R. H. (1980). Recolección y Envío de Muestras al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario. Dr. Mora No. 15-7o. piso. México, D. F.

- as, Ch. W.; Binford, Ch. H.; Utz, J. P. (1970). Medical Micology. 3rd Edition. Lea and Febiger. Philadelphia, U. S. A.
- er, S. (1968). Practical Mycology: Manual for Identification of Fungi. Revised Edition. Hafner Publishing Company, Inc. New York and King's - Upon - Thames. U. S. A.
- no de la Torre, G.; Juárez, L. C.; Figueroa, T. H. H.; (1977). Ascomycotas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. 3a. reimpression. Editorial Limusa. México.
- N.A.R.; Gooday, W.; (1984). A Model for the Germ Tube Formation and Serial Growth Form of Candida albicans. Saboraudia. J. Med. Vet. Microbiol. Vol. 22 2: 137 - 143.
- n, W. A.; Bruner, D. W., (1970). Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 3a. edición. La Prensa Mexicana. México.
- s, J.; Hámori, D.; (1972). El Cuidado de los Animales Domésticos. Colección Málaga, S. A., México.
- n, E.; Gordon, M.; (1970). Laboratory Identification of Pathogenic Bacteria Simplified. Third Edition. American Lecture Series.
- S. S. Dirección General. (1978). Laboratorio Clínico: Procedimientos. 3a. edición. México.
- S.; Biberstain, E.; Barajas, R.J.A.; (1974). Diagnóstico Microbiológico. Departamento de Bacteriología y Micología. F.M.V.Z. U.N.A.M. México.
- s, J. D.; (1976). Bacteriología Clínica Básica. 1a. edición. Editorial El Manual Moderno. México.
- z, E.; Melnick, E. A.; (1983). Manual de Microbiología Médica. 9a. edición. Editorial, El Manual Moderno. México.
- S. V. F.; Kennedy, P. C.; (1973). Patología de los Animales Domésticos. Edición española. (tomo 1). Editorial Labor, Barcelona, España.

36. Jungerman, F. P.; Schwartzman, M. R.; (1977). Micología Médica Veterinaria. 1a. edición. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
37. Keilbach, B. N. M.; (1983). Gua para la Realización de Necropsias y el Diagnóstico de Algunas Enfermedades de los Animales Domésticos. Tesis Profesional. F.E.S./Cuatitlán/UNAM. México.
38. Kelly, W. R.; (1981). Diagnóstico Clínico Veterinario. 4a. impresión. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
39. Kourary, M.; (1976). Obtención y Manejo de Muestras para Exámenes Microbiológicos de las Enfermedades Transmisibles. 1a. edición. Organización Panamericana de la Salud. O.M.S. México.
40. López-Alvares, J.; Barajas, R.J.A.; (1982). Manual de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. Departamento de Bacteriología. F.M.V.Z./UNAM. México.
41. Mac Faddin, J. F.; (1979). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins. Company Reprinted. Baltimore, U.S.A.
42. Martin-Pascual, A.; Vázquez, R.; (1979). Dermatofitos (Aspectos Clínicos y Morfología Ultraestructural) Atlas. 1a. edición. Ediciones Universidad de Salamanca. España.
43. Merck - México, S. A. (1983). Medios de Cultivo Merck; Criterios de Calidad. División Química. México.
44. Neugebauer, J.; (1983). Atlas de Enfermedades Infecciosas. 1a. edición. Ediciones (Roche), Basilea.
45. Odds, F. C.; (1979). Candida and Candidosis. First Edition. University Park Press. Baltimore, U.S.A.
46. Oswaldiston, G. W.; (1983). Técnicas de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1a. edición. Editorial Acribia. España.
47. Pijoan, A. C.; Ciprian, C. A.; Lastra, G. A.; (1978). Manual de Identificación de Bacterias de Interés Veterinario. 2a. edición. Talleres Gráficos de Guadarrama Impresores, S. A., México.

48. Rebel, G.; Taplin, D.; (1974). Dermatophytes, Their Recognition and Identification. Second Edition. University of Miami Press, U.S.A.
49. Rodríguez, M. G.; González, R.; Mariño, L.; (1978). Manual de Técnicas en Microbiología. Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias. Bogotá D. E. Colombia.
50. Segretain, G.; Drouhet, E.; Mariat, F.; (1977). Diagnóstico de Laboratorio en Micología Médica. 1a. reimpresión. La Prensa Médica Mexicana. México.
51. Smith, A. L.; (1977). Microbiology Laboratory Manual and Workbook. Fourth Edition. The C.U. Mosby Company. Saint Louis Missouri, U.S.A.
52. Smith, T. D.; Conant, F. N.; (1960). Bacteriología de Zinsser. 2a. edición. U.T.E.H.A. U.S.A.
53. Thienpont, D.; Rochette, F.; Vamparijs, D. S. J.; (1979). Diagnóstico de Helminthiasis por medio de Examen Coprológico. Chinoin, División Veterinaria. España.
54. Van, Demark, J.P.; Seeley, W. H.; (1973). Microbios en Acción; Manual de Laboratorio para Microbiología. 1a. edición en español. Editorial Blume. México.
55. Willis, A. T.; (1977). Anaerobic Bacteriology; Clinical and Laboratory Practice. Third Edition. Butterworths (Publishers) Inc. London- Boston.
56. Wistreich, A. G.; Lechtman, D. M.; (1978). Prácticas de Laboratorio en Microbiología. 2a. edición. Editorial Limusa. México.
57. Zapater, C. R.; (1970). Introducción a la Micología Médica. 2a. edición. Editorial "El Ateneo". Argentina.
58. Zemjanis, R.; (1981). Reproducción Animal; Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. 6a. reimpresión. Editorial Limusa. México.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

APARTADO POSTAL 5-345. MEXICO D.F. 06500. FAX 250 71 54 TEL. 5 31 59 03

CABLE IICAGROEA-TELEX 1763492 OEAMEX- 176375 IICAME

Digitized by Google