



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:

Microbiología General y Farmacéutica

FQByF

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

**Guías de Trabajos Prácticos:
Microbiología General y Farmacéutica**

Dra. Susana G. Ferrari
Esp. Verónica I. Gómez
Mg. Ángel G. Salinas
Farm. Mariana E. Cozzolino
Dra. Patricia G. Silva

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2017

DECANA

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

VICE DECANA

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. Estela Isabel GASULL

COMISIÓN DE LA SERIE DIDÁCTICA

Coordinadora

Mag. Susana E. VILLAGRA

Integrantes

Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fgbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

Microbiología General y Farmacéutica es un curso obligatorio del cuarto año de la Carrera de Farmacia que pertenece al ciclo de formación biomédica. Microbiología es una rama de las ciencias biológicas que aborda el estudio de los seres vivos pequeños, denominados microorganismos o microbios, cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano. Este curso introduce al alumno al estudio de las células procariotas, eucariotas y virus, abordando sus diferentes morfologías, metabolismos, crecimientos y mecanismos genéticos. Proporciona conocimientos generales de la esterilización, desinfección y manufactura aséptica como métodos primordiales del trabajo microbiológico dentro en las ciencias farmacéuticas. Además, se desarrollan conceptos aplicados de la microbiología que comprenden el conocimiento de los diferentes agentes patógenos involucrados en el desarrollo de las enfermedades infecciosas, el entendimiento de la utilización de los compuestos antimicrobianos y los procesos biotecnológicos en los que se hallan implicados los microorganismos en la producción de fármacos y biosimilares.

Posee un crédito horario de 135 horas, distribuido en diez horas semanales que se complementan con el dictado de seis horas de clases teóricas y cuatro horas de trabajos prácticos de laboratorio y aula durante 15 semanas de cursado. A los efectos de garantizar la integración de los contenidos, los requisitos para cursar la asignatura son tener regularizados los cursos Fisiología y Fisiopatología.

Índice general

0	Bioseguridad en el laboratorio de microbiología	1
0.1	Objetivos	1
0.2	Introducción	1
0.3	Riesgo en las técnicas comunes de laboratorio	2
0.4	Niveles de Bioseguridad	2
0.5	Prácticas Microbiológicas Estándares	3
0.6	Reglas generales a tener en cuenta	4
0.7	Gabinetes de seguridad biológica	4
0.8	Bibliografía	5
1	Esterilización - Medios de cultivo	7
1.1	Esterilización	7
1.2	Nutrición y cultivo de microorganismos	12
1.3	Parte práctica	20
1.4	Bibliografía	27
2	Siembra, aislamiento y conservación	29
2.1	Concepto de siembra	29
2.2	Aislamiento	31
2.3	Métodos de conservación de cultivos bacterianos	32
2.4	Parte práctica	37
2.5	Bibliografía	38
3	Identificación fenotípica	39
3.1	Introducción	39
3.2	Características de los cultivos microbianos	40
3.3	Coloraciones	42
3.4	Metabolismo microbiano	46
3.5	Manejo del Manual Bergey	50
3.6	Parte práctica	51
3.7	Bibliografía	51
4	Identificación genotípica	53
4.1	Introducción	53
4.2	Técnicas moleculares	53
4.3	Identificación genotípica de microorganismos	60
4.4	Parte práctica	63
4.5	Bibliografía	64
5	Recuento microbiano	65
5.1	Recuento o enumeración de células	65
5.2	Masa celular	70

5.3	Actividad celular	73
5.4	Parte práctica	75
5.5	Bibliografía	75
6	Cinética microbiana	77
6.1	Sistemas de cultivos microbianos	77
6.2	Crecimiento de levaduras	80
6.3	Parte práctica	83
6.4	Bibliografía	85
7	Enfermedades infecciosas	87
7.1	Parte práctica	87
7.2	Bibliografía	87
8	Evaluación de desinfectantes	89
8.1	Factores que afectan el proceso de desinfección.	89
8.2	Evaluación de agentes desinfectantes	91
8.3	Parte práctica	97
8.4	Bibliografía	98
9	Antimicrobianos	103
9.1	Introducción	103
9.2	Tipos de actividad antimicrobiana	103
9.3	Mecanismos moleculares de acción de los antimicrobianos	104
9.4	Pruebas de sensibilidad	105
9.5	Parte práctica: Pruebas de sensibilidad "in vitro"	111
9.6	Bibliografía	113
10	Detección de compuestos bioactivos	115
10.1	Aislamiento de la cepa productora	117
10.2	Búsqueda de la actividad antimicrobiana	117
10.3	Identificación del microorganismo y mejoramiento genético	119
10.4	Análisis de la estructura química y evaluación de toxicidad y actividad terapéutica en animales infectados	120
10.5	Producción y optimización de los procesos fermentativos	120
10.6	Procesamiento post-fermentación	120
10.7	Escalado industrial	121
10.8	Parte práctica	122
10.9	Bibliografía	125
11	Detección de resistencias	127
11.1	Introducción	127
11.2	La resistencia intrínseca y adquirida	127
11.3	Elementos involucrados en la transferencia horizontal de la resistencia.	129
11.4	Mecanismos de resistencia adquirida	131
11.5	Detección de mecanismos de resistencia	135
11.6	Parte Práctica	138
11.7	Bibliografía	141

12 Productos inmunológicos	143
12.1 Vacunas	143
12.2 Inmunoseros	153
12.3 Inmunoglobulinas humanas	154
12.4 Parte práctica	156
12.5 Bibliografía	156

0 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología

0.1. Objetivos

1. Conocer los riesgos potenciales de trabajar en el laboratorio y la forma de evitarlos o minimizarlos.
2. Promover actitudes responsables y seguras de las personas que operan en el laboratorio de Microbiología.

0.2. Introducción

Las personas que trabajan en un laboratorio de Microbiología están expuestas, además de los riesgos potencialmente graves como sustancias y vapores tóxicos, explosivos, carcinógenos, sustancias cáusticas, etc. al riesgo de infección (irrupción de un agente extraño capaz de multiplicarse -virus, hongo, bacteria, etc.- dentro del organismo). La infección difiere de la mayoría de los otros riesgos en que los efectos no están limitados a quien trabaja individualmente ni a sus compañeros de trabajo, sino que también, puede transmitirse fuera del laboratorio, a partir de su persona, a su familia, contactos humanos casuales, animales domésticos o de experimentación, etc. Además pueden diseminarse agentes no patógenos para los seres humanos, pero capaces de contaminar medios de cultivo, reactivos o afectar a otros seres vivos.

Las vías de infección más comunes en el laboratorio son:

- Tracto digestivo: por ingestión o transferencia de microorganismos desde manos contaminadas.
- Mucosas: nasal y conjuntiva, por aerosoles, salpicaduras y manos contaminadas.
- Piel-vía percutánea: por inyección, cortes o escoriaciones.
- Respiratoria: es la más importante. El 80 % de las infecciones contraídas en el laboratorio son de origen aéreo por inhalación de aerosoles.

La importancia de la vía respiratoria radica en que con facilidad se producen pequeñas gotas y partículas. Las partículas más pequeñas (entre 1 - 4 μm) no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan a pulmón. Además la mayoría de los microorganismos patógenos posee la capacidad de invadir tejido pulmonar, siendo su infectividad dependiente, entre otros factores, del tamaño de la dosis, la susceptibilidad individual y la virulencia del agente.

Las partículas con tamaño menor a 10 μm son denominadas aerosoles y pueden ser generados por atomización de suspensiones líquidas y/o molido muy fino de material sólido infectado.

Muchas técnicas de laboratorio producen aerosoles mediante burbujeo, salpicadura, espuma, quemado del ansa y dos mecanismos adicionales: vibración de alta frecuencia y fuerza centrífuga. Los aerosoles también se producen cuando se manipulan cultivos secos, liofilizados o secados con acetona (ej. cuando se destapan tubos o ampollas).

0.3. Riesgo en las técnicas comunes de laboratorio

Además de la producción de aerosoles hay que tener en cuenta el riesgo que se genera como consecuencia de la deposición de material infectado sobre otras superficies a partir de las cuales los microorganismos pueden ser transferidos a la piel, boca y ojos. Por ejemplo las pipetas que se preparan para conservar su esterilidad hasta ser usadas, poseen un tapón de algodón en la parte superior para prevenir la entrada de polvo (práctica usual). Sin embargo, el tapón protege relativamente a quien usa la pipeta ya que es fácilmente penetrado por microorganismos en suspensiones líquidas.

Otro elemento comúnmente usado en el laboratorio de Microbiología es el ansa de cultivo. Mediante el flameado del ansa contaminada se puede producir diseminación de organismos, particularmente cuando se trabaja con inóculos semisólidos (ej. suspensiones de esporas, colonias de *Mycobacterium* o esputo). El mismo riesgo se corre cuando se introduce el ansa caliente en un líquido, o se hace contacto con la superficie de agar de un cultivo. A su vez, el ansa fría, una vez cargada, puede contaminar cuando se producen vibraciones o rápidos movimientos de aire que causen desprendimiento de pequeñas gotas. Por otra parte, la remoción de tapones de algodón, tapas a rosca o tapones de goma u otro tipo de tapa en tubos con caldo de cultivo, tubos de centrífuga, etc., puede crear aerosoles de varias maneras, sobre todo si los cultivos han sido agitados y hay material particulado. Hay que tener presente que los tapones de medios líquidos (sobre todos los agitados) pueden estar humedecidos con material infeccioso.

Por las razones antes descritas se adoptan diversas medidas preventivas siendo importante la protección física del trabajador a través del uso de guardapolvo, guantes, barbijo, gafas, uso de propipeta, etc. El guardapolvo o chaqueta es una necesidad para quien trabaja en el laboratorio. Sin embargo, el hecho de estar prendido adelante, dejando la parte superior al descubierto, predispone en caso de salpicaduras o volcaduras a la contaminación de la ropa de calle y al manipuleo de botones contaminados. Por otra parte las técnicas de laboratorio deben realizarse en forma cuidadosa y preferiblemente dentro de cámaras de bioseguridad o utilizando flujo laminar vertical.

0.4. Niveles de Bioseguridad

Los laboratorios se clasifican en cuatro niveles de acuerdo a las prácticas realizadas y a los microorganismos manipulados. Poseen los siguientes requerimientos:

Nivel de bioseguridad	Prácticas y técnicas	Equipamiento de seguridad
1	Prácticas microbiológicas estándares y ropa de laboratorio.	Ninguno
2	Ídem 1 más acceso limitado, guantes protectores y señales de peligro biológico.	Gabinetes de seguridad Clase I ó II para disminuir alto riesgo de exposición a aerosol.
3	Ídem 2 más ropa de laboratorio especial y acceso controlado.	Gabinetes de bioseguridad I ó II
4	Ídem 3 mas cambio de ropa antes de entrar y salir de la sala. Todos los deshechos son descontaminados	Gabinete de seguridad Clase III más traje presurizado para protección total.

0.5. Prácticas Microbiológicas Estándares

1. El acceso al laboratorio se encuentra limitado o restringido cuando se están llevando a cabo experiencias con microorganismos, según criterio del docente a cargo.
2. Las personas deben lavarse las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes. Antes de dejar el laboratorio, quitarse el guardapolvo, lavarse cuidadosamente las manos con agua y jabón y desinfectarlas.
3. No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
Las personas que usan lentes de contacto en laboratorios deben también utilizar anti-parras o un protector facial. Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
4. Está prohibido pipetear con la boca; deben utilizarse dispositivos mecánicos o propipetas.
5. Deben establecerse normas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.
6. Todos los procedimientos deben llevarse a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
7. Las superficies de trabajo deben descontaminarse como mínimo una vez por día y luego de todo derrame de material viable.
8. Todos los cultivos y otros desechos deben descontaminarse antes de ser descartados mediante un método aprobado, como por ejemplo autoclave. Los materiales a descontaminar son colocados en un recipiente resistente para su transporte desde el laboratorio. Los elementos que se descontaminan fuera del laboratorio deben embalarse de acuerdo a las normas municipales, provinciales y nacionales vigentes antes de retirarlos del establecimiento.
9. Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se encuentren presentes agentes infecciosos. La señal debe incluir el nombre del agente o agentes en uso y el nombre y número de teléfono del investigador.
10. Debe existir un programa de control de roedores e insectos.

0.6. Reglas generales a tener en cuenta

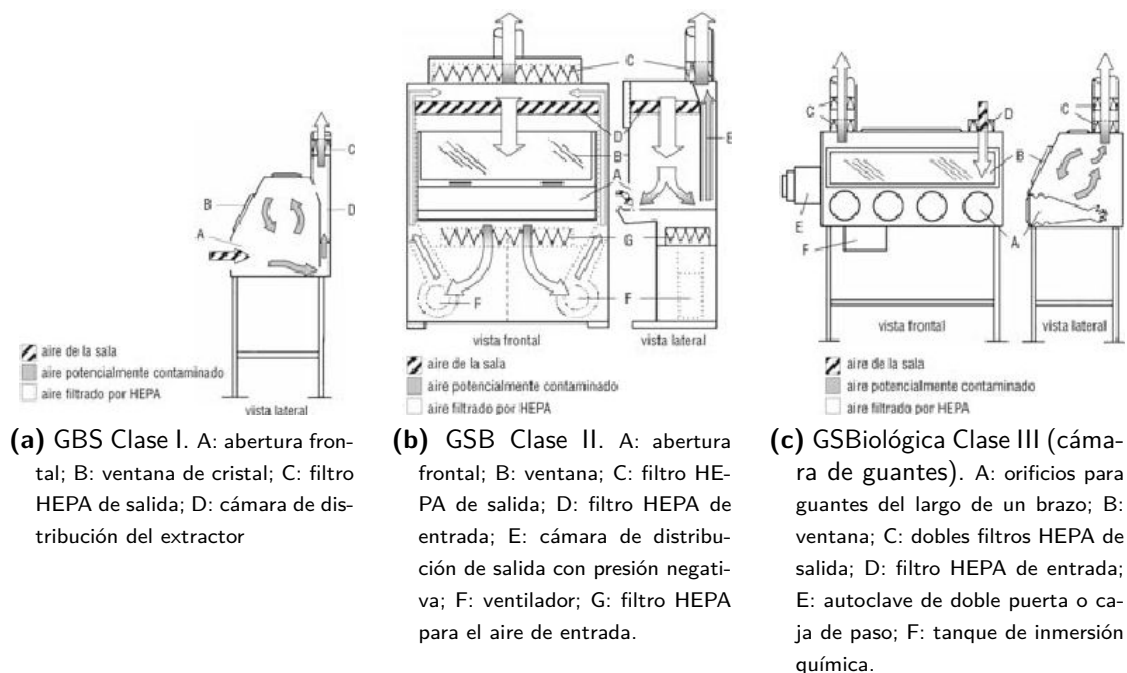
1. Reportar los accidentes, no importa lo insignificante que puedan parecer. Debe reportar toda enfermedad o lastimadura tan rápido como sea posible. La pérdida de tiempo en la identificación de una infección de laboratorio puede tener graves consecuencias.
2. Tratar a todos los microorganismos como patógenos potenciales o contaminantes para los cultivos vecinos. Rotular todo el material infeccioso para prevenir confusiones. Los números en código no son adecuados.
3. Tener un desinfectante listo para ser usado en suficiente volumen para llevar a cabo una descontaminación de emergencia en el caso de salpicaduras. Asegurarse que el desinfectante sea activo contra el organismo que está siendo manejado.
4. Nunca llevar a cabo una acción apresuradamente, en particular aquellas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, volcaduras o contaminar superficies que es necesario mantener limpias (ej. las tapas de las botellas).

0.7. Gabinetes de seguridad biológica

El GSB es el dispositivo utilizado para proporcionar contención de salpicaduras o aerosoles infecciosos generados por diversos procedimientos microbiológicos. Existen 3 clases de GSB (Clase I, II, III) utilizados en laboratorios microbiológicos.

Tipo I: Es un gabinete de presión negativa en el cual el aire ingresa por una abertura frontal. El aire ingresado sale al laboratorio o al exterior después de haber pasado, en su totalidad, a través de un filtro HEPA. Protege al operador pero no al producto.

Figura 0.7.1: Gabinetes de Seguridad Biológica. *Extraído de "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories". CDC/NIH. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 4ª Ed. 1999*



Tipo II: Este tipo de gabinete tiene un diseño que protege:

1. al operador, posee presión negativa e ingresa aire por su parte anterior a velocidad adecuada.
 2. al producto, mediante un flujo laminar hacia abajo de aire filtrado con HEPA.
 3. al ambiente, ya que el aire se elimina después de pasar a través de un filtro HEPA.
- Este tipo de gabinetes se subdivide en varios subtipos.

Tipo III: Dan el mayor nivel de protección al operador, al producto y al ambiente. Son herméticamente cerrados. Para la manipulación se usan guantes sellados a la pared frontal de la cabina. Funcionan también con presión negativa. El aire que ingresa pasa a través de filtro HEPA y el que egresa pasa por dos filtros HEPA colocados en serie o a través de un filtro HEPA y posterior tratamiento con calor. La salida del aire de la cámara debe estar conectada a un sistema independiente de extracción de aire del edificio.

0.8. Bibliografía

Ferrari SG, Mattana CM, Di Genaro, MS y Favier, GI. "Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología", Nueva Editorial Universitaria, UNSL. 2011.

Organización Mundial de la Salud (OMS) Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3° Edición. Ginebra. 2005.

1 Esterilización y medios de cultivo

1.1. Esterilización

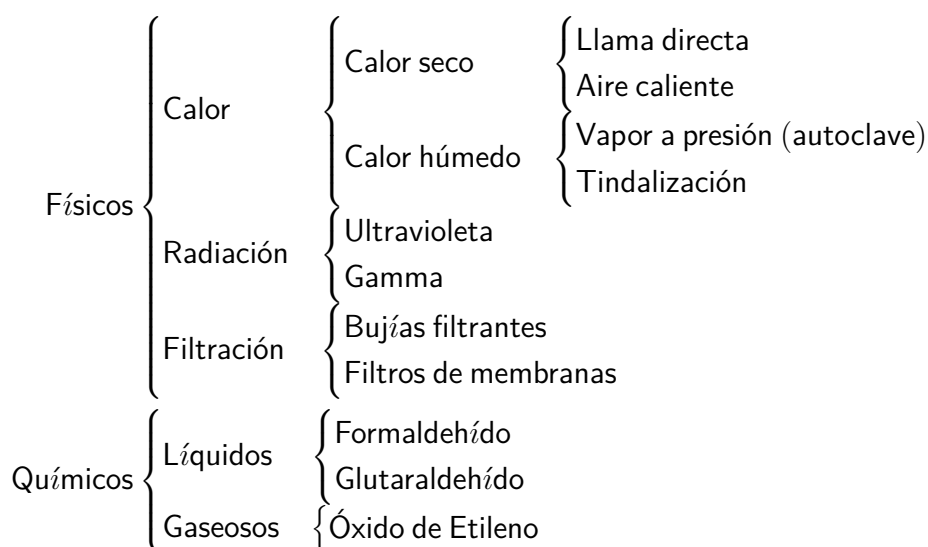
1.1.1. Introducción

Esterilización es el conjunto de operaciones destinadas a eliminar o matar todas las formas de seres vivientes contenidos en un objeto o sustancia. La Farmacopea Argentina (VII Edición) enumera y define los procedimientos por acción directa a la llama, por acción indirecta de la llama (con estufas de calor seco), vapor de agua a presión superior a lo normal, acción directa del agua o su vapor saturado a temperaturas no superiores a 100 °C, por calentamiento repetido (tindalización) y otros.

La esterilización posee diversas aplicaciones, entre ellas en la práctica médico-quirúrgica, en el laboratorio de microbiología e incluso en la higiene y el saneamiento diario de locales, alimentos, etc. Es una etapa esencial en el procesamiento de cualquier producto destinado a la administración parenteral o que entre en contacto con pieles dañadas, mucosas u órganos internos donde exista posibilidad de infección. Además, se realiza esterilización de vestimentas y otros materiales contaminados para minimizar el riesgo de infección asociado a estos artículos.

Como en los últimos años ha aumentado la variedad y cantidad de materiales que se requieren en la asistencia de la salud e industria farmacéutica y alimenticia, las técnicas de esterilización han adquirido importancia creciente.

1.1.2. Métodos de esterilización



La eficacia de un proceso de esterilización depende de la elección apropiada del método de esterilización. En todos los materiales a ser esterilizados existe un riesgo potencial de daño del

producto. Por lo tanto, es necesario alcanzar un balance entre el riesgo máximo aceptable de falla en el proceso de esterilización y el nivel máximo aceptable de daño en el producto. Un proceso de esterilización se puede seleccionar para alcanzar la máxima eliminación / muerte con el mínimo deterioro del producto. Las razones para esterilizar son principalmente: para prevenir la transmisión de enfermedades, la descomposición de materiales por microorganismos y / o para eliminar la competencia por los nutrientes en un medio de fermentación y permitir así el desarrollo específico de un solo tipo de microorganismo de interés industrial, ya sea por ellos mismos (ej. levaduras) o por algunos de sus metabolitos (ej. antibióticos, enzimas, etc.)

Los materiales a esterilizar pueden ser de diversos tipos y para distintos usos, por ejemplo: equipo permanente (gabinetes de bioseguridad, fermentadores, etc), ropa para usar en áreas estériles, filtros esterilizantes, agua y medios de cultivo de laboratorio, productos farmacéuticos, líquidos parenterales, aire para áreas estériles, para aireación de fermentación, etc.

1.1.3. Esterilización por calor

La esterilización por calor, siempre que su aplicación no afecte la resistencia o estabilidad de los materiales, es el sistema que más conviene aplicar por ser el más eficaz y seguro. Además es el método más estudiado y dotado de equipos para todas las situaciones que se puedan presentar en la práctica.

Esterilización por calor húmedo

En este método la causante de la muerte celular es la **coagulación de las proteínas y enzimas celulares**, mientras que el calor seco destruye principalmente por complejos procesos de oxidación.

El calor húmedo actualmente encuentra una amplia aplicación en el procesamiento de muchos productos termoestables. En el ámbito farmacéutico y médico se utiliza en la esterilización de vestimentas, contenedores, bolsas (pouches), botellas, viales, jeringas, líquidos e instrumental médico en diferentes envases. Sea cual sea la naturaleza de la carga, el producto se ubica en bandejas o jaulas para optimizar su distribución.

La esterilización por calor húmedo generalmente comprende el uso de vapor a temperaturas comprendidas en un rango de 115 a 134 °C. Estas elevadas temperaturas sólo se pueden realizar por la generación de vapor bajo presión.

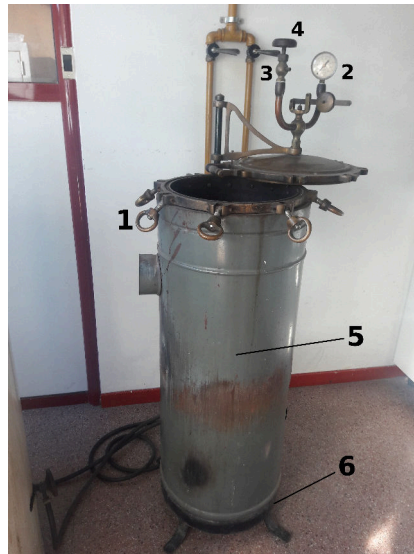
Para actuar como agente esterilizante eficiente, el vapor debe ser capaz de proveer humedad y calor eficientemente al artículo a ser esterilizado. Esto se hace más efectivo usando vapor saturado, el cual es vapor en equilibrio térmico con el agua de la cuál deriva.

El calor húmedo posee ventajas sobre el calor seco ya que tiene mayor efecto sobre las bacterias porque al ser el agua un buen conductor, el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente; el tiempo de exposición es menor y se pueden esterilizar medios de cultivo.

Autoclave Chamberland

El autoclave (calor húmedo a presión) es un aparato que consta de paredes dobles y doble fondo, donde se coloca el agua, calefaccionando en la parte inferior y, en la parte superior una tapa que cierra herméticamente mediante charnelas (mariposas). En la parte superior de la tapa hay una espita para el escape de vapor, un manómetro para medir la presión y una válvula de seguridad. Ver figura Figura 1.1.1

Figura 1.1.1: Autoclave Chamberland: 1) mariposas o charnelas para el cierre hermético, 2) manómetro, 3) espita, 4) válvulas de seguridad, 5) agua, 6) fuente de calor.



Se debe controlar que en el fondo del autoclave haya agua suficiente para todo el proceso. Se coloca el material a esterilizar previamente acondicionado, el mismo no debe estar herméticamente cerrado por eso se prefieren tapones de algodón o gasa-algodón. El material es envuelto en papel poroso (papel manteca o papel blanco).

Una vez acomodado el material dentro del autoclave, se cierra la tapa, ajustando las mariposas o charnelas enfrentadas para asegurar un cierre hermético. Se enciende el mechero, se abre la espita para eliminar todo el aire que queda en el interior del autoclave (que se indica por el escape de un chorro continuo de vapor por la espita). Es importante realizar esta operación ya que si queda en el interior del autoclave una mezcla vapor-aire, al ser éste último menos conductor del calor, se logran temperaturas menores e insuficientes para una buena esterilización. Se cierra la espita. El manómetro comienza a marcar el aumento de presión hasta 1 atm., que corresponde a 121 °C. Se deja **15-20 minutos a 121 °C**, aunque el tiempo depende del volumen, cantidad y naturaleza del material a esterilizar.

Transcurrido el tiempo, se apagan los mecheros y cuando el manómetro indica cero de presión, recién se abre la tapa del autoclave y se retira el material. No se debe abrir la espita sino que se debe dejar que la presión descienda sola. El material de vidrio se seca en estufa mientras que los medios de cultivo son colocados en la heladera para disminuir así el riesgo de contaminación y para su mejor conservación. El funcionamiento del autoclave está fundado en que a mayor presión la temperatura de ebullición del agua aumenta.

Esterilización por calor seco

Es de aplicación reducida, porque se requieren temperaturas elevadas (superiores a 160 °C) y además porque pocos materiales resisten la acción oxidante del calor a esa temperatura en presencia del aire. Se puede aplicar sólo cuando la naturaleza del material no permite someterlo a la acción del vapor a presión.

- **Acción directa a la llama:** Se utiliza para esterilizar instrumentos de uso ocasional como tijeras, ansas de uso bacteriológico, agujas, portaobjetos, etc. La Farmacopea Argentina indica tres formas de aplicarlo:

- Sometiendo el material a la llama hasta llevarlo al rojo, manteniéndolo así durante cinco a diez segundos.
- Colocando el material en un recipiente adecuado, vertiendo en él cierta cantidad de alcohol, variable de acuerdo al tamaño del material, encendiendo el alcohol y moviendo el recipiente en forma tal que la llama pase por toda la superficie del material durante dos o tres minutos.
- Pasando rápido y repetidas veces el material por la llama durante dos o tres minutos.
- **Estufa de esterilización:** El calor seco se aplica con más frecuencia calentando el aire en el interior de una **estufa** diseñada especialmente para tal fin. El diseño debe asegurar una distribución homogénea de la temperatura. Se debe determinar el tiempo de esterilización a partir del momento en que la cámara y el material alcanzan la temperatura seleccionada. La Farmacopea Argentina exige una temperatura de 160–170 °C durante 1 hora.

La única **ventaja** de este método se refiere a los casos en que es necesario tener el producto estéril, completamente seco, como cuando se trata de material de vidrio, acero inoxidable, o en la esterilización de vaselina, aceites o soluciones oleosas, sobre todo si están envasados en recipientes herméticos. También puede usarse para la esterilización de polvos, que es muy difícil por su mala conductividad que hace muy prolongado el tiempo de calentamiento.

La construcción de la estufa es relativamente simple, ya que consta de una caja por lo general de cobre, con una puerta frontal y estructura metálica, con ingreso de aire caliente o los gases de combustión en la parte inferior, con una salida regulable colocada en la parte superior. La calefacción puede ser de gas o eléctrica, regulable con un termostato que lo controle.

No es práctico establecer una sola relación temperatura - tiempo, para materiales farmacéuticos y hospitalarios. Para la esterilización de productos hospitalarios se suele usar: **170 °C - 1 hora, 160 °C - 2 horas, 150 °C - 2,5 horas o 140 °C - 3 horas**. Los agentes quimioterápicos, los polvos con bajo punto de fusión, ciertos líquidos en aceite (por ej. dimercaprol) y otras sustancias requieren ciclos diseñados especialmente en que se utilizan temperaturas más bajas por ese tiempo.

1.1.4. Filtración

La filtración es una operación fundamental que el farmacéutico practica desde los tiempos más remotos en forma artesanal. La aplicación de la filtración a la esterilización de fluidos es una consecuencia de estos estudios, cuyo mecanismo de acción permite la separación física de los microorganismos del medio líquido o gaseoso por un dispositivo poroso que los retiene por acción mecánica fundada en el tamaño de los poros y por adsorción, siendo este último un fenómeno físico.

La esterilización por filtración se puede dividir en dos grandes grupos, la esterilización de líquidos y la esterilización de gases, en particular de aire y su extensión a la esterilización de ambientes.

Esterilización de líquidos, agua destilada y soluciones para uso inyectable.

Los filtros deben reunir las siguientes condiciones:

- No alterar la composición ni los caracteres organolépticos del líquido.
- No ceder materiales solubles al líquido.
- Retener los gérmenes con seguridad.
- Tener una porosidad uniforme en toda su superficie, sin determinar mucha pérdida en el flujo del líquido.
- Soportar las diferencias de presión necesarias para obtener un caudal eficaz y no sufrir alteraciones estructurales por alteración de las soluciones.
- Ser fáciles de limpiar o de preferencia descartables.
- Soportar la esterilización por vapor a 121 °C.
- Económicos, no sólo por su costo directo, sino también por las maniobras de preparación.

Los materiales cerámicos como porcelanas no vitrificadas, vidrio poroso y placas de asbesto fueron utilizados inicialmente para la retención de partículas. Cada uno de estos tipos presentó dificultades propias, que se superaron realizando tareas especiales de limpieza, lavados químicos previos a la filtración y el empleo de dispositivos de retención de partículas más groseras.

La aparición de membranas descartables para la filtración, la ha transformado en el elemento de elección para la preparación de filtros destinados a la esterilización de soluciones parenterales. La resistencia que determina la pérdida de carga en la solución a filtrar se puede vencer por el empleo de bombas impulsoras del líquido, por presión ejercida sobre el recipiente donde se ha preparado la solución o por vacío, aunque no es recomendable por el peligro de contaminación del líquido filtrado desde el recipiente de recolección del líquido estéril. Casi siempre se usan membranas con poros de 0,22 a 0,45 micrones, pero los fabricantes proveen materiales que pueden variar su porosidad entre 12 micrones y 5 milimicrones. Pueden emplearse los de mayor tamaño como prefiltros, dejando los de cerca de 0,22 micrones para la esterilización propiamente dicha, evitando que obturen sus poros con rapidez.

En la práctica de esterilización por filtración de soluciones, la aplicación más común es la destinada a la preparación de inyectables en solución acuosa, fraccionada en ampollas.

Se esteriliza por separado el filtro armado, de preferencia por vapor a 121 °C – 20 minutos o con óxido de etileno (OE) con todas sus conexiones dispuestas de tal manera que permitan acceso seguro del vapor o del gas. Asépticamente se coloca la membrana filtrante. El líquido a filtrar se recibe en un recipiente estéril, que se conecta asépticamente al filtro por uniones flexibles estériles, reduciendo las maniobras de conexión al mínimo indispensable, y se practica en área estéril en los recipientes definitivos.

1.1.5. Control del proceso de esterilización

Además de los requerimientos de validación del autoclave a través de normas (ISO EN 285, ISO EN 17665, etc), se debe verificar el proceso de esterilización. Para ello se usan diferentes indicadores:

Indicadores físicos

Sufren modificaciones en su estructura por ablandamiento o fusión de las sustancias que lo componen. Sólo nos dicen si la temperatura alcanzada en el proceso de esterilización fue correcta, no indica nada acerca de lo que ocurrió con los microorganismos presentes en la muestra. Ej. Ácido benzoico que funde a 121 °C.

Indicadores químicos:

Actúan por cambios de color, pH, etc. Un ejemplo es el rojo de metilo usado en el control de esterilización en el método que emplea el OE como agente esterilizante, y permite medir la penetración del gas a través de las paredes de un sobre de polietileno. Junto con el material a esterilizar con OE ya envasado se coloca un sobre que contiene una solución de $MgCl_2$ en medio sulfúrico y un indicador de pH, el rojo de metilo. Se colocan en sobres de polietileno 3, 6 y 12 ml de solución, se cierran al calor. La liberación de HCl por acción del OE sobre el $MgCl_2$ determina el viraje del indicador. Sin embargo el uso de estos indicadores no presenta ninguna garantía real sobre la esterilidad del producto terminado, sólo nos dice si el OE penetró o no dentro de la bolsa.

El método preferible para verificar la esterilidad no es ensayar productos estériles, sino utilizar indicadores biológicos, sin embargo, estos no se pueden utilizar cuando los productos se esterilizan por filtración y se los envasan asépticamente en sus recipientes finales, como sucede con drogas importantes como antibióticos, hormonas e insulina.

Indicadores biológicos:

Son esporas muy resistentes que existen en cantidades mayores que la contaminación normal de los productos y que tienen una resistencia igual o mayor que la flora microbiana que hay en los productos que se esterilizan. Las especies de bacterias comúnmente aceptadas que se usan como indicadores biológicos se enumeran en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1: Especies bacterianas utilizadas como indicadores de esterilización

Método de esterilización	Especie bacteriana
Calor húmedo	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Calor seco	<i>Bacillus subtilis</i>
Oxido de etileno	<i>B. stearothermophilus</i>
Radiación	<i>Bacillus pumilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>

También pueden utilizarse otras especies siempre que cumplan con los siguientes requisitos:

- Que se encuentren en mayores cantidades que los presentes normalmente en la muestra.
- Que presenten mayor resistencia en comparación con las características de contaminación del material.

1.2. Nutrición y cultivo de microorganismos

Previamente a que los microorganismos se dividan ocurren reacciones químicas con el objeto de formar estructuras específicas denominadas en su conjunto, metabolismo. Estas reacciones metabólicas pueden ser de dos tipos: si existe liberación de energía se denominan reacciones catabólicas (catabolismo) y si por el contrario, se consume energía se denominan reacciones anabólicas (anabolismo).

1.2.1. Nutrición microbiana

Cada microorganismo necesita nutrientes específicos y en cantidades diferentes. Así se encuentran los macronutrientes que son aquellos requeridos en grandes cantidades y los micronutrientes que se requieren en pequeñas cantidades.

Además de los requisitos elementales, los microorganismos poseen requerimientos energéticos y específicos por factores de crecimiento.

Requisitos Elementales:

Los siguientes elementos se necesitan en cantidades relativamente importantes C, H, N, O y P, considerados **macronutrientes** junto con. Otros elementos son necesarios en menores concentraciones (K, S, Ca, Fe y Mg) y se denominan **microelementos**. Los **oligonutrientes** son los que se encuentran en cantidades de trazas, entre ellos Mn, Zn, Co, Ni, Mo y Cu. Estas necesidades elementales son comunes a todas las bacterias pero difieren en la forma asimilable bajo la cuál deben ser proporcionadas.

Fuente de carbono: El carbono es requerido para la síntesis de los componentes celulares (biomasa). Los microorganismos **autótrofos** requieren únicamente carbono en forma de dióxido de carbono. Se dividen en **fotótrofos** cuando utilizan la energía proveniente de la luz y **litótrofos** cuando obtienen su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos. Los **heterótrofos** pueden utilizar sustancias simples como ácido acético, citrato de sodio, etanol o glucosa; o bien carbohidratos complejos (almidón).

Fuente de nitrógeno: La forma en la cuál se requiere nitrógeno depende de la capacidad enzimática del organismo. En algunos casos los microorganismos pueden fijar directamente el nitrógeno de la atmósfera, son los conocidos como fijadores de nitrógeno, a su vez dentro de ellos podemos distinguir dos tipos principales:

Simbióticas: leguminosas - *Rhizobium*; *Azolla* - *Anabaena*

No simbióticas: *Azotobacter*, cianobacterias (algas verde azuladas)

Según la especie de microorganismo también pueden obtener el nitrógeno de nitratos, nitritos, amoníaco o grupos amino provenientes de una fuente de carbono orgánica, esta última se adiciona al medio de cultivo en forma de peptonas, las cuales además de actuar como fuente de nitrógeno, actúan como fuente de carbono y minerales, y poseen además una función amortiguadora de pH debido a su carácter anfótero.

Fuente de hidrógeno y oxígeno: obtenidos a partir del agua; siendo el O₂ provisto principalmente por el aire.

Fuente de azufre: algunos microorganismos reducen el sulfato, otros utilizan azufre reducido como sulfuros y tiosulfatos, y algunas bacterias lo obtienen de formas orgánicas (metionina, cisteína, etc).

Fuente de fósforo: Es siempre introducido como fósforo inorgánico.

Metales: Se adicionan al medio como sales minerales. Los oligonutrientes, generalmente, están presentes como contaminantes de los ingredientes del medio de cultivo. Sin embargo algunos microorganismos pueden tener requerimientos por algunos micronutrientes y se deben adicionar al medio.

Requisitos Energéticos

Todo organismo viviente requiere una fuente de energía. Según la fuente de energía que puede ser utilizada por los microorganismos se pueden clasificar en:

Fotótrofos: utilizan la luz como fuente de energía

Quimiolitotrofos: utilizan sustancias inorgánicas como fuente de energía

Quimiorganotrofos: utilizan sustancias orgánicas como fuente de energía.

También pueden agregarse al medio sustancias fermentables que pueden ejercer una doble función:

1. Proporcionar reservas de energía fácilmente disponibles, siempre que los microorganismos elaboren las enzimas necesarias para fermentar las sustancias respectivas.
2. Ser utilizados en la identificación y clasificación, mediante reacciones de fermentación de las sustancias adicionadas. Ej: arabinosa, lactosa, sacarosa, etc.

Factores de crecimiento

Los microorganismos autótrofos o heterótrofos, pueden requerir para el crecimiento pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos que son sustancias esenciales que el organismo es incapaz de sintetizar a partir de los nutrientes disponibles. Tales compuestos se denominan factores de crecimiento y son requeridos en pequeñas cantidades por las células porque cumplen roles específicos en la biosíntesis. La necesidad de un factor de crecimiento es el resultado de la falta o bloqueo de una vía metabólica en las células. Cuando un microorganismo es incapaz de sintetizar un compuesto indispensable para su crecimiento se denomina **auxótrofo**. Si la auxotrofia surge por mutación, el mutante se denomina auxótrofo, mientras que a la cepa salvaje se la llama prototrófo.

Los factores de crecimiento pueden ser:

Purinas y pirimidinas: requeridas para la síntesis de ácidos nucleicos (DNA o RNA), Factor X (hemina), Factor V (nicotinamida adenina dinucleótido).

Aminoácidos: requeridos para la síntesis de proteínas.

Vitaminas: necesarias como coenzimas y grupos funcionales de ciertas enzimas y minerales.

1.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son ambientes nutritivos, naturales ó artificiales, que pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos, que le proveen al microorganismo todos los requerimientos necesarios para su crecimiento y multiplicación y que se deben aproximar lo más posible a su hábitat natural o nicho ecológico.

Clasificación de los medios de cultivo

Según su consistencia { sólidos (agar, albumosos, etc)
líquidos (caldo nutritivo, agua peptonada)
semisólidos (agar blando, agar SIM)

Según su origen	{	artificiales (caldo nutritivo, agar nutritivo)
		naturales (leche, suero sanguíneo, papa, zanahoria)
Según su composición	{	sintéticos (composición química definida)
		complejos (con compuestos químicos conocidos y desconocidos preparados con tejidos animales o vegetales)
Según su uso	{	comunes (caldo nutritivo, agar nutritivo)
		especiales (de conservación, enriquecimiento, diferenciales, etc)

Componentes que habitualmente se adicionan al medio de cultivo

1. Agua

El agua debe ser destilada o bidestilada; y desionizada en caso de efectuar el cultivo de células especiales (por ej. cultivo de tejidos)

2. Peptonas

Son hidrolizados de proteínas de distinto origen y son directamente asimilables por las bacterias. Hay distintos tipos de peptonas cuya naturaleza va a depender del sustrato utilizado y del método de obtención. Los sustratos pueden ser: fibrina, caseína, músculo o corazón de buey, soja, semillas de algodón, etc. y los métodos de obtención:

- Hidrólisis ácida: Tiene el inconveniente que en el proceso de hidrólisis se destruyen ciertos aminoácidos, por ejemplo el triptofano, el cuál es esencial para algunas bacterias.
- Hidrólisis enzimática: se efectúa utilizando enzimas que actúan sobre las proteínas (ejemplo de enzimas: tripsina, quimotripsina, papaína).

La función más importante de las peptonas en el medio de cultivo es el suministro de nitrógeno.

3. Extractos

Extracto de carne: Aporta dos tipos de productos: nitrogenados (péptidos, creatina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, etc) y no nitrogenados (glucógeno, ácido láctico, ácido succínico, grasa, sales inorgánicas). Se añade para proporcionar al medio de cultivo sustancias que estimulen la actividad microbiana (vitaminas, minerales, aminoácidos)

Extracto de levadura: Este extracto estimula notablemente el desarrollo bacteriano, y se emplea con frecuencia en medios de cultivo en lugar de extracto de carne. Es producido a partir de levadura de panadería mediante autólisis a 50-55°C ó mediante plasmólisis en presencia de altas concentraciones de NaCl. Es una gran reserva de vitaminas del complejo B y se prefiere para microorganismos más exigentes. Contiene además: aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. La composición del extracto varía de un lote a otro, debido a que los sustratos utilizados para el cultivo de las levaduras afectan la calidad del extracto obtenido.

Extracto de malta y raíz de malta: Son menos ricos, con menos contenido en vitaminas que los anteriores, pero con alto contenido en maltosa y sacarosa. Se usan para preparar medios de cultivo para hongos filamentosos y levaduras.

Líquido macerado de maíz: Es un producto secundario obtenido en la producción del almidón y del azúcar a partir del maíz. Aporta al medio de cultivo: aminoácidos, ácido láctico, vitaminas, fuente de carbono, nitrógeno y azufre, sales minerales y en el caso de la fermentación de la Penicilina G aporta ácido fenilacético, precursor de la cadena lateral de la molécula de Penicilina.

4. Sustancias solidificantes

Agar: sustancia mucilaginosa seca que se extrae de varias especies de algas marinas roja (agarofitas). Constituida por dos polímeros: pectina y agarosa, que son polímeros de beta-galactosa y ácido glucurónico esterificado con ácido sulfúrico y ácido pirúvico libre. El agar es muy útil en aplicación en Microbiología debido a su amplia diferencia entre su punto de fusión (80-100 °C) y solidificación (45-50 °C) lo cual permite sembrar medios agarizados al estado líquido sin destruir los microorganismos y además es atacado por pocas bacterias. Se puede utilizar en distintas concentraciones: 1,5-2 % (para medios comunes), 4 % (para agar duro) y 0,3-0,4 % (para agar blando o semisólido)

Gelatina: es una proteína que se prepara hidrolizando el colágeno con agua hirviendo: pocas veces sustituye la gelatina al agar en la preparación de medios sólidos porque la atacan muchas bacterias, y porque funde a 37 °C y no permite realizar aislamientos. Se añade a los medios de cultivo principalmente para estudiar la capacidad de licuefacción de los microorganismos, aspecto de importancia en la identificación y clasificación de bacterias.

Otras sustancias solidificantes: sílica gel, suero, albúmina de huevo

5. Hidratos de carbono

Generalmente se añaden a los medios de cultivo con dos fines importantes:

- servir de fuente de carbono y energía
- permitir la identificación y clasificación de las bacterias. Ej. glucosa, lactosa, sacarosa, etc.

Parámetros físico-químicos que afectan el crecimiento

La composición del medio de cultivo no es la única condición necesaria para un buen cultivo microbiano. También hay que tener en cuenta:

1. Hidratación

El crecimiento de los microorganismos depende básicamente de la disponibilidad de agua. Es esencial para la función enzimática de las proteínas. Esta debe ser destilada ya que el agua corriente contiene iones calcio y magnesio que pueden reaccionar con los fosfatos de las peptonas, extracto de carne y otros componentes del medio de cultivo y dar fosfatos insolubles.

2. Temperatura

Se debe conocer el rango de temperatura óptimo para el desarrollo. Según el requerimiento de temperatura los microorganismos se pueden clasificar en:

- psicrófilos: cuando crecen a temperaturas inferiores a 20°C
- mesófilos: son los patógenos para el hombre, crecen entre 18-45°C

- termófilos: cuando crecen a más de 45°C. La temperatura se regula en cámaras de cultivo adecuadas, las más comunes son las estufas de incubación.

3. Presión osmótica

La mayoría de las bacterias son muy tolerantes a las variaciones de presión osmótica porque poseen paredes celulares rígidas, pero se debe adicionar NaCl a los medios de cultivo que tienen agregados de sangre, en los cuales si no se regula la presión osmótica se hemolizan rápidamente los eritrocitos y no se podría apreciar una reacción hemolítica. Además es necesario el agregado de NaCl en los medios para bacterias halófilas que necesitan concentración salina muy elevada. En caso de manipularse esferoplastos o protoplastos, debe ser regulada convenientemente mediante el agregado de sales como KCl 5 % y sacarosa 20 %.

4. pH

Los medios de cultivo se ajustan a diversos grados de acidez o alcalinidad según el pH que convenga a los microorganismos que se van a cultivar. Algunos microorganismos crecen mejor en medios ácidos, otros en medios alcalinos y otros prefieren la neutralidad, este último grupo comprende a la mayoría de las bacterias. Es necesario por lo tanto ajustar el pH de los medios de cultivo. Para medirlo en el medio de cultivo se emplean diferentes métodos como las cintas de pH o el peachímetro y se ajusta al valor deseado con soluciones ácidas (HCl) o alcalinas (NaOH). En algunos casos el pH debe ser regulado durante la incubación debido a que por su metabolismo el microorganismo libera compuestos ácidos ó básicos y puede variar tanto el valor del pH que se constituye en un factor limitante del crecimiento. En este caso se utiliza para regularlo el agregado de buffers al medio de cultivo, tales como KPO_4H_2 / K_2PO_4H y $HCO_3^- / CO_3^{=}$ en condiciones estériles.

5. Condiciones atmosféricas

El oxígeno es un nutriente esencial para ciertas bacterias denominadas aerobias, otras pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo y se denominan facultativas. Hay un grupo de microorganismos que requieren una pequeña cantidad de oxígeno, son los microaerófilos y aquellos que crecen en ambientes privados de este elemento son los anaerobios. Muchas bacterias crecen mejor en presencia de dióxido de carbono.

1.2.3. Medios de cultivos especiales para bacterias

Medio de conservación o transporte

Se utilizan sólo en aquellos casos en que no se puede realizar el cultivo inmediatamente de tomada la muestra, poseen un mínimo aporte de nutrientes que permiten la recuperación de los organismos sin que haya replicación. Ej. Medio Stuart, medio Cary-Blair, frascos T.A.B (anaerobios).

Medio de rehabilitación o preenriquecimiento

Es un medio no inhibidor que permite el desarrollo de aquellas bacterias que hayan sufrido daño subletal. Ej. Caldo lactosado (para *Salmonella*)

Medio de enriquecimiento

Son medios líquidos que cumplen con la condición de ser adecuado para el organismo que se trata de enriquecer y que sea tan inapropiado como sea posible para el crecimiento de otros microorganismos. El enriquecimiento de algunos microorganismos se logra variando ciertos factores ambientales, composición del medio, tensión superficial. Cuando se quiere enriquecer microorganismos exigentes, es más difícil porque los medios que normalmente son suficientes para ellos también lo son para los menos exigentes y se debe recurrir a inhibidores selectivos como pH, sales, inhibidores específicos como verde de malaquita para *Salmonella* y *Shigella*. Ej. Caldo selenito de Leifson que lleva en su composición selenito de sodio. Este caldo inhibe las bacterias Gram positivas y limita totalmente (12-18 hs) el crecimiento de coliformes y , favoreciendo el desarrollo de *Salmonella* y *Shigella*.

Medios enriquecidos

Son medios de cultivo comunes que se les agregan sustancias nutritivas como azúcares, sangre, vitaminas, suero, etc. Se utilizan para obtener una cosecha microbiana abundante, un crecimiento más rápido ó permitir el desarrollo de ciertos microorganismos que en medios comunes no desarrollan. Ej. agar sangre.

Medios de aislamiento

Son medios sólidos que a su vez pueden ser:

No selectivos: No llevan sustancias inhibitoras, en ellos desarrollan todos los microorganismos que puedan subsistir a partir de los nutrientes que poseen. Ej. agar sangre.

Selectivos: Además de los componentes comunes de todos los medios de cultivo, llevan por lo general un indicador de pH (rojo neutro, rojo fenol), y sustancias inhibitoras. Son medios que permiten el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos e impide el desarrollo de los demás. Ej. Medio Mac Conkey, lleva como inhibidores cristal violeta y sales biliares, y como indicador de pH rojo neutro.

Debido a su especificidad biológica ciertos antibióticos son particularmente útiles como agentes inhibitoras. Así la penicilina es más activa contra bacterias Gram (+), en tanto que la estreptomycinina lo es contra bacterias Gram (-). La penicilina en grandes concentraciones puede actuar como bactericida para procariontas, pero no resulta tóxica para los eucariotas, por lo que es útil para purificar cultivos de protozoos, hongos y algas eucarióticas que estén contaminadas con bacterias. A su vez los organismos procariontas son resistentes a antibióticos como nistatina, la cual se utiliza para aislar bacterias de medios contaminados con hongos. Otras sustancias que pueden emplearse en este tipo de medios son colorantes, tales como fucsina, tionina, cristal violeta, etc.

Medios diferenciales

Son aquellos que poseen en su composición alguna sustancia que al desarrollar la bacteria en estudio y producir su metabolismo da origen a una coloración que es característica de esa especie bacteriana, o bien pone en evidencia una o más pruebas bioquímicas características como pueden ser movilidad, licuación de la gelatina, fermentación de algún azúcar, etc. Ej. TSI.

Medios selectivos y diferenciales

Es una combinación de los dos anteriores. La composición del medio permite el desarrollo de una bacteria o tipo bacteriano y al mismo tiempo se produce alguna prueba metabólica o coloración característica del microorganismo. Ej. EMB.

1.3. Parte práctica

1.3.1. Objetivos

1. Adquirir criterios sobre la preparación del material a esterilizar por calor húmedo.
2. Conocer el funcionamiento y manejo del autoclave.
3. Conocer el funcionamiento y manejo del equipo de filtración.
4. Preparar distintos medios de cultivos microbiológicos.

1.3.2. Esterilización

Se realizará de manera demostrativa:

1. Modo de preparación de distintos instrumentales para su esterilización en autoclave.
2. Manejo del autoclave, estufa de esterilización y equipo de filtración.

1.3.3. Medios de cultivo

Procedimiento

1. Pesada de los componentes
Los medios de cultivo deshidratados son, en principio, riesgosos. Contienen sustancias peligrosas y tóxicas, como las sales biliares, azida, selenito, colorantes, etc y el polvo. La inhalación del polvo durante el pesaje puede ser peligrosa y debe evitarse mediante el uso de mascarilla facial.
Utilizar para los medios una balanza con una precisión no menor a $\pm 0,1$ g. Para componentes selectivos, colorantes, etc la balanza debe ser analítica con una precisión mínima de $\pm 0,001$ g.
Limpiar la balanza después de pesar, ya que restos de polvo pueden contaminar las partes internas y perjudicar la exactitud de la misma. La limpieza se debe realizar con etanol 70 %.
2. Disolución (rehidratación) de los componentes o medios de cultivo deshidratados.
El recipiente a utilizar debe tener 2 a 3 veces el volumen de el medio de cultivo que se prepare. Agregar al recipiente aproximadamente un tercio del volumen de agua requerida, esto evita la adherencia del medio a la fondo y reduce la aparición de grumos. El polvo pesado debe ser transferido por completo del papel en que se pesó al recipiente con agua, evitando esparcir polvo en el aire o que quede pegado en las paredes del recipiente. Sacudir vigorosamente hasta que se disuelva. Progresivamente añadir la cantidad restante de agua y enjuagar cuidadosamente cualquier material adherido a las paredes del recipiente.
3. En general, todos los componentes de un medio de cultivo, son solubles en agua, a excepción del agar que forma una capa de sedimento en el fondo. Por lo mismo, los medios que incluyen agar en su composición deben dejarse remojar durante varios minutos y luego ser calentados hasta fundir el mismo. Comprobar previamente que no haya restos de medio no disueltos pues se pueden quemar y cambiar la composición de la preparación. El calentamiento debe hacerse en un baño de agua, con agitación frecuente para asegurar

una distribución uniforme del calor. Apenas el medio empiece a hervir debe ser retirado de la fuente de calor, debido a que casi todos los medios de cultivo contienen peptonas o extractos que son sensibles al calor. El sobrecalentamiento de los medios de cultivo con un alto contenido de azúcar y peptonas provoca reacciones de Maillard (caramelización) con la formación de sustancias inhibitoras del crecimiento y colores más oscuros. Estos medios de cultivo no pueden ser utilizados, ya que se prepararon incorrectamente. Una vez fundido el agar se obtiene una solución viscosa que fluye suavemente y sin partículas visibles sobre las paredes del recipiente después de agitar. Permitir que los medios que contienen agar se enfríen a $47 \pm 2^\circ\text{C}$ antes de la esterilización en autoclave.

4. A continuación deberá esterilizarse el medio, y dependiendo de la forma en que vaya a ser utilizado, el procedimiento será diferente:
 - a) Medios de cultivo líquidos: una vez disueltos los componentes distribuir en tubos, tapar y esterilizar en autoclave. Dependiendo del medio en cuestión y la finalidad con la que se lo va a usar, se definirá el tamaño de los tubos y la cantidad de medio por tubo.
 - b) Medios de cultivo sólidos en tubo: luego de fundido el agar, repartir el medio aún caliente y líquido en tubos de tamaño adecuado. Tapar, dejar enfriar y esterilizar en autoclave. A continuación (el medio se habrá vuelto a fundir) dejar enfriar y solidificar (con los tubos bien tapados) en posición vertical o inclinada según sea necesario.
 - c) Medios de cultivo sólidos en placas de Petri: luego de fundido el agar, dejar entibiar, tapar el matraz o erlenmeyer con tapón de algodón, cubrir con papel y autoclavar. Luego dejar enfriar a $45 - 50^\circ\text{C}$ (el enfriamiento disminuye la cantidad de humedad que se condensa cuando el medio líquido se solidifica en las placas). A continuación se vierten de a 12 a 15 ml de este medio enfriado (pero aún perfectamente líquido) en placas de Petri estériles. Para evitar la contaminación durante este procedimiento, son necesarias varias precauciones:
 - 1) Primero, cuando se retira el medio fundido del autoclave, se seca el exterior del recipiente con un paño o papel absorbente, pues sino el agua caerá sobre las placas e introducirá contaminación.
 - 2) A continuación, cuando se quita el algodón o cubierta para verter el medio, debe flamearse la boca del recipiente para matar los microorganismos que pudieran haber. Al momento de verter el medio, se levanta la tapa de la placa solamente por un lado, apenas lo suficiente para permitir el paso de la boca del recipiente.
 - 3) Después de haber vertido el medio en la placa, ésta se tapa inmediatamente y se rota sobre la mesada de manera de formar una capa uniforme. Dejar solidificar.
 - d) Medios que necesitan del agregado de suplementos lábiles al calor posteriormente al autoclavado: tanto los medios líquidos como los agarizados se esterilizan en el erlenmeyer con tapón de algodón y cubierta de papel. Luego, respetando la técnica aséptica, añadir el suplemento mencionado, homogeneizar y distribuir en tubos o placas según corresponda, siguiendo las precauciones ya mencionadas.

Caldo nutritivo

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g

Disolver estos componentes en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 (6.8-7.2). Envasar en tubos de hemólisis 3 ml. Tapar. Esterilizar en autoclave 15 min a 120 °C.

Este medio es apto para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutritivos, es decir, es un medio de cultivo utilizado con fines generales y permite el desarrollo de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales.

Agar nutritivo

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 (6.8-7.2). Fundir. Envasar en tubos en cantidades de 10-14 ml si se desea obtener agar derecho (para volcar en Placa de Petri), o 7 ml si se desea obtener agar inclinado o en pico de flauta. Luego tapar con algodón, tapa a rosca o tapa de plástico, esterilizar en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Antes de solidificar los tubos que contienen 7 ml se inclinan sobre una tabla para obtener el pico de flauta.

Cuando se desea realizar la prueba de la movilidad, se emplea agar nutritivo al 0,3 %

Tripteína Soja Caldo (TSC)

Digerido pancreático de caseína (tripteína)	17 g
Digerido papaínico de harina de soja	3 g
NaCl	5 g
Fosfato dipotásico	3,25 g
Glucosa	2,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

Medio para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos, tanto aerobios como anaerobios facultativos.

Fundamento: La tripteína y la peptona de soja aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de gran variedad de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El fosfato dipotásico otorga capacidad buffer y la glucosa es la fuente de energía.

Tripteína Soja Agar (TSA)

Tripteína	15 g
Peptona de soja.....	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

Adicionado con sangre, este medio es adecuado para observar reacciones de hemólisis; cuando se prepara como agar chocolate, es un buen medio para el cultivo de *Neisseria*, *Brucella*, *Haemophilus influenzae* y organismos similares.

Agar sangre

Agar nutritivo en volumen adecuado y estéril.
Glóbulos rojos de carnero o humanos del grupo 0.

Fundir el agar a Baño María en ebullición y enfriarlo a 45 - 50 °C. Adicionar la cantidad adecuada de sangre para lograr una proporción final igual al 5 %. Mezclar bien y distribuir asépticamente en cajas de Petri estériles. Imprimir suaves movimientos de rotación para lograr una buena distribución en el fondo de la caja. Secar y sembrar.

Su alto valor nutritivo permite el crecimiento de gran una variedad de microorganismos.

Fundamento: Los glóbulos rojos (GR) permanecen intactos y el medio toma el color de la sangre fresca. Algunas bacterias crecen en el agar sangre sin alterarlo, otras hemolizan al GR en varios grados. Las bacterias que lo lisan con un completo aclaramiento del medio que rodea la colonia son microorganismos β hemolíticos. Algunas bacterias lisan las células pero degradan la hemoglobina completamente dejando metahemoglobina en el medio (α hemólisis ó hemólisis parcial), mientras que las bacterias que no muestran efectos visibles (hemólisis nula) sobre los GR se denominan γ hemolíticas (gamma hemolíticas)

Agar Chocolate

Este medio usa la misma base que el agar sangre (ver sec. 1.3.3), pero una vez que se adiciona la sangre al medio base, la temperatura se eleva lo suficiente para que los GR se lisen parcialmente (75- 80 °C) tornando al medio de cultivo de color marrón chocolate. De este modo la hemoglobina y otros nutrientes presentes en el GR lisado, hemina (también conocida como factor "X"), y la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (llamado factor "V") son adicionados como suplementos a agar base nutricionalmente enriquecido. Este medio es adecuado para el crecimiento de microorganismos fastidiosos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus*.

Agar E.M.B (eosin methylene blue)

Peptona	10,0 g
Lactosa	5,0 g
Sacarosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	2,0 g
Agar	13,5 g
Eosina	0,4 g
Azul de Metileno	0,065 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 7,2 ± 0.2	

El medio agar eosina azul de metileno (EMB) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

Fundamento: La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas.

Las bacterias que fermentan la lactosa producen ácido que actúa sobre los colorantes dando colonias de centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter* presentan un brillo metálico característico. Otros fermentadores de lactosa producen colonias grandes mucoides, siempre con un centro púrpura.

Este medio permite el crecimiento de *Candida* como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en *Candida albicans*. *Enterococcus* crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* y otras bacterias oxidativas pueden dar colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0,5 % y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Siembra: En superficie, estriar a partir de un inóculo poco denso, para obtener colonias aisladas. Incubar a 35 °C 24 - 48h.

Interpretación de los resultados

Microorganismo	Tipo de colonia
<i>E. coli</i>	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Enterobacter, Klebsiela</i>	Mucosas, rosadas, confluentes
<i>Proteus, Salmonella, Shigella</i>	Incoloras
<i>Enterococcus</i>	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Candida</i>	Incoloras o rosadas, secas, puntiformes
<i>Acinetobacter</i>	Azul lavanda, pequeñas a medianas

Características del medio:

- Medio preparado: verde con matriz naranja, puede tener un ligero precipitado.
- Placas preparadas: púrpura anaranjado verdoso.

Agar T.S.I. (triple sugar iron)

Extracto de carne	30 g
Pluripeptona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Sulfato de hierro y amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	13 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	7,3 ± 0,2

Medio universalmente empleado para la clasificación de enterobacterias que permite investigar la capacidad de fermentar glucosa, lactosa, sacarosa y liberar sulfuros.

Fundamento: La fermentación de los azúcares que da lugar a una producción de ácido, se detecta por medio del indicador rojo de fenol, los cambios de color al amarillo por una acidificación y a rojo por una alcalinización se evidencian perfectamente. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Siembra

1. Tocar con el ansa una colonia sospechosa de la superficie de un medio selectivo y sembrar en tripteína soya agar.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.
3. Sembrar el TSI por punción en el fondo y en la superficie del medio. Incubar a 37 °C por 24 hs.

Interpretación de resultados

Microorganismos	Fondo	Superficie	SH ₂
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AG	A	-
<i>E. coli</i>	AG	A	-
<i>Proteus vulgaris</i>	AG	A	+
<i>Shigella sonnei</i>	A	Nc o K	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	A	K	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	AG	K	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K	K	-

AG: ácido con gas (amarillo) A: ácido K: alcalina

Características del medio: Medio preparado: de color rojo

Caldo Tioglicolato con indicador

Extracto de levadura	5 g
Tripteína	15 g
Glucosa	5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
L-cistina	0,5 g
Tioglicolato de sodio	0,3 g
Agar	0,75 g
Resazurina	0,001 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.1 ± 0.2	

Favorece el desarrollo de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios. Las especies aerobias desarrollan en la parte superior mientras que las facultativas o estrictas lo hacen en la profundidad del tubo. Las sustancias reductoras como tioglicolato y cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente.

Es el caldo de enriquecimiento usado más frecuentemente en microbiología clínica, usa 0,075 % de agar para prevenir que las corrientes de convección introduzcan oxígeno atmosférico al caldo. El ácido tioglicólico también actúa como agente reductor, disminuyendo el Eh del medio. Con la adición de diversos factores nutrientes, tales como caseína, levadura y extracto de carne, vitaminas y otros, este medio mejora el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. Otros suplementos nutricionales, un indicador de óxido-reducción (resazurina), dextrosa, vitamina K1 y hemina, han sido adicionadas en varias fórmulas modificadas

Agar Saboureaud Glucosado (hongos)

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se disuelven los componentes en agua destilada, homogeneizar bien. Ajustar el pH a 5,6. Distribuir en tubos para la obtención de picos de flauta. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120 °C. No tiene agentes selectivos los que pueden ser agregados al medio de cultivo. El bajo pH favorece el crecimiento de hongos sobre bacterias.

Medio de transporte de Cary y Blair

Tioglicolato de sodio	1,5 g
Fosfato disódico	1,1 g
NaCl	5 g
Agar	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH 8,4 ± 0.2	

Suspender en agua destilada y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto más hasta disolver. Enfriar a 50 °C y agregar 9 ml de una solución de CaCl₂ al 1 %. Ajustar pH, distribuir y esterilizar 15 minutos a vapor fluente.

Fundamento: Medio recomendado para la recolección y transporte de muestras. Es un medio con un mínimo aporte de nutrientes que permite la recuperación de microorganismos sin que haya replicación. El tioglicolato de sodio se incluye para proveer un bajo potencial redox; valores de pH relativamente alto minimiza la destrucción bacteriana por acidificación.

MRS

Este medio fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que permita un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Monoleato de sorbitan	1 ml
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agar	13 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6,4 ± 0.2	

1.4. Bibliografía

A.D. Russell, W.B. Hugo & G.A. J. Ayliffe. "Principles and practice of disinfection, Preservation and Sterilization" Ed Blackwell Science (1999)

J. Helman. "Farmacotecnia: Teoría y Práctica", Vol. 1-8. Ed. Continental (1980).

A.R. Gennaro "Remington. Farmacia", Tomo 1 y 2. Ed. Panamericana (2003)

SM. Finegold, Bailey, WR Bailey "Bailey-Scott Diagnóstico Microbiológico". Ed. Panamericana (1996)

JF MacFaddin "MacFaddin Pruebas bioquímicas para la identidad de bacterias de importancia clínica. 3ªEd. Ed. Panamericana (2003)

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. (2000)

2 Siembra, aislamiento y conservación de microorganismos

2.1. Concepto de siembra

Se le llama siembra al acto de transferir un microorganismo desde su hábitat natural o nicho ecológico a un medio de cultivo adecuado, elegido de acuerdo a sus exigencias vitales, que permita así su desarrollo y multiplicación si se lo coloca a una temperatura adecuada durante un tiempo conveniente.

Las siembras pueden efectuarse a partir de distintos materiales tales como tierra, aire, agua, alimentos, materiales biológicos (esputo, orina, etc.), o distintos materiales inertes como fármacos, cosméticos, paredes, mesadas, etc.

Los microorganismos habitan diversas partes de nuestro cuerpo (cavidad oral, tracto gastrointestinal o la piel) y el medioambiente (aire, suelo y agua). Una idea de la magnitud y complejidad de las poblaciones microbianas que se encuentran en la naturaleza se puede tener considerando el contenido de microorganismos por ejemplo por gramo de tierra provenientes de un jardín: bacterias: billones, hongos: cientos de miles, algas y protozoos: varios miles. Muestras de la cavidad oral del hombre pueden contener billones de bacterias / ml de muchas especies distintas.

En todas las localizaciones los microorganismos se encuentran como poblaciones mixtas, por lo que el conocimiento de la presencia de un determinado microorganismo requiere utilizar técnicas adecuadas para separar un cultivo polimicrobiano en sus microorganismos constituyentes, es decir la obtención de un cultivo puro (monomicrobiano).

La siembra se efectúa bajo normas de **asepsia rigurosa** para impedir que desarrollen junto con los microorganismos en estudio, microorganismos que no pertenezcan a la muestra y para impedir el escape de gérmenes patógenos desde los cultivos al medio ambiente (técnica aséptica). Todas las siembras se efectúan en medios de cultivo previamente esterilizados y todo el instrumental empleado debe estar estéril también.

Los **elementos utilizados en la siembra** pueden ser ansas (recta o en anillo), pipetas, espátulas de Drigalsky o hisopos (para sembrar superficies grandes como cajas de Petri o botellas de Roux). Cualquiera de estos elementos debe elegirse según el tamaño y el estado físico del inóculo a sembrar. Por ej. si es pequeño (líquido o sólido) usaremos el ansa recta (por punción) en cambio si es abundante y líquido, una pipeta, y si es sólido el ansa en anillo. Los medios a sembrar pueden ser líquidos (incolores, coloreados, para observar la producción de gas con campanita de Durham), ó sólidos.

2.1.1. Técnica aséptica

Para sembrar un cultivo microbiano en un medio estéril, un cierto número de células (inóculo), se transfieren (o inoculan) al medio con precauciones especiales para conservar la pureza del

cultivo.

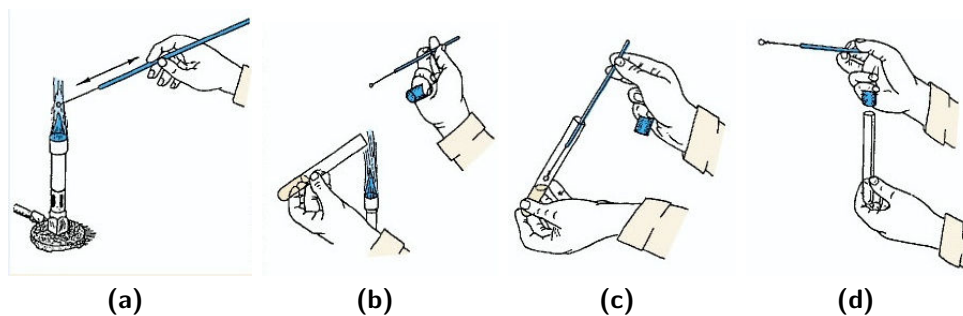
La técnica de siembra debe realizarse al abrigo de las corrientes de aire (puertas y ventanas) y con movimientos pausados, poco amplios y sin brusquedad.

En el procedimiento de siembra, el ansa de cultivo, debe calentarse al rojo sobre la llama (esterilización por calor seco) inmediatamente antes y después de hacer la transferencia (Figura 2.1.1 a). Este calentamiento destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del ansa. Se mantiene el ansa hacia abajo, sobre la llama, para calentarla en su totalidad incluyendo la parte inferior del mango. Durante la siembra, se mantiene el tubo en la mano izquierda y se sostiene el tapón con el dedo meñique de la mano derecha (o a la inversa en caso de personas zurdas) (Figura 2.1.1 c).

Precaución: no debe depositarse nunca el tapón sobre la mesa de trabajo y la parte del tapón que se introduce en el tubo no debe entrar en contacto con la piel ni objeto alguno, a fin de evitar posibles contaminaciones.

Mantener el tubo lo más cerca posible de la horizontal durante la siembra. Las bocas de los tubos de donde tomamos los cultivos y las de aquellos que van a ser transferidos, deben también flamearse antes y después de que el ansa sea introducida y retirada (Figura 2.1.1 b). Además de destruir cualquier organismo del borde del tubo, el flameado tiende a crear corrientes de convección hacia fuera, decreciendo así el riesgo de contaminación.

Figura 2.1.1: Técnica aséptica de siembra. *Extraído de Microbes in action 4ª Ed. A Laboratory Manual of Microbiology. Seeley HW, Vandemark PJ, Lee JJ. 1991.*



2.1.2. Métodos de siembra.

Siembra en medios líquidos: (caldo, agua peptonada, medio mineral de fosfato, etc.)

Una manera sencilla de obtener cultivos bacterianos es cultivándolos en medios líquidos en tubo. Los medios transparentes se pueden sembrar con ansa recta, en anillo, o bien con pipetas estériles tratando de transportar poco inóculo. Se debe sembrar siguiendo las indicaciones dadas en técnica aséptica. Cuando se utiliza pipeta estéril, hay que pasarla ligeramente sobre la llama, antes de cargarla con inóculo. Una vez usada, colocarla en recipientes que contienen solución de desinfectantes. Después de sembrar el tubo, rotular e incubar.

Siembra en medios sólidos

En tubos inclinados (pico de flauta): El medio inclinado es simplemente un tubo de ensayo conteniendo un medio con agar que, durante su enfriamiento, se colocó inclinado.

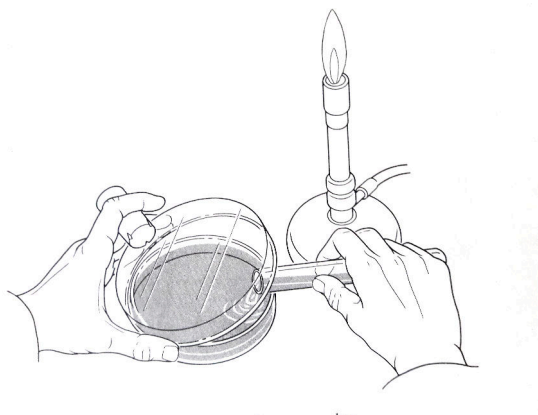
El contenido de un tubo así tratado, se solidifica quedando una superficie inclinada, que se puede inocular fácilmente con un ansa recta o en anillo. Para sembrar se mueve el ansa suavemente sobre la superficie del medio, con un movimiento trazando estrías a intervalos de pocos milímetros empezando por abajo, y llegando a la parte superior del tubo, teniendo cuidado de **no dañar** el medio. Se debe sembrar siguiendo las indicaciones de técnica aséptica. Una vez sembrado el tubo, rotular e incubar.

En tubos por picadura vertical: Una vez tomado el material a sembrar se introduce rápidamente el ansa en el seno del medio fresco. Hecho esto, se retira el ansa rápidamente se flamea la boca del tubo y se tapa. Se esteriliza el ansa. Se incuban los tubos recién sembrados. El desarrollo se producirá a lo largo de la picadura. Esta técnica sirve para conocer, en especial, si un microorganismo es móvil o no cuando se usan medios al 0,3-0,5 % de agar.

En placas de Petri por agotamiento: sembrar trazando estrías abarcando toda la superficie de un medio solidificado en una placa de Petri, del mismo modo que para medios en pico de flauta.

En placas de Petri por placa vertida: consiste en mezclar el inóculo y el medio de cultivo fundido y entibiado (45-50 °C) en la placa de Petri, de modo de que los microorganismos queden distribuidos homogéneamente una vez que el medio se solidifique nuevamente (Figura 2.1.2).

Figura 2.1.2: Siembra por placa vertida. *Extraído de Microbes in action 4ªEd. A Laboratory Manual of Microbiology. Seeley HW, Vandemark PJ, Lee JJ. 1991.*



2.2. Aislamiento

Consiste en realizar una **siembra** del material en estudio, en un medio apropiado, con el fin de desarrollar colonias lo más separadas posibles, para obtener a partir de ellas cultivos puros.

Cultivo puro es una población de células derivadas todas ellas de una única célula. La obtención de un cultivo puro es en realidad una condición artificial impuesta en el laboratorio.

El aislamiento se realiza siempre en un **medio sólido**, ya que cada célula se inmoviliza en el lugar en el que se encuentra, en lugar de flotar de un lado a otro como sucede en un medio líquido. Al quedar fija, cada célula viable origina una "colonia" de células hijas que crece hasta formar una masa fija, visible. Si las células primitivas se ubican distantes entre sí, cada célula viva origina una colonia separada, diferente.

2.2.1. Métodos de aislamiento

1. Por agotamiento en placa

2. Por placa vertida

3. Empleo de medios selectivos

El aislamiento en medios selectivos permite aislar aquellos microorganismos que son resistentes a los agentes inhibidores empleados en el medio de cultivo y así seleccionando el medio selectivo adecuado, podemos a partir de cultivos mixtos obtener cultivos puros.

4. Aislamiento por enriquecimiento

Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, se incluye una primera etapa que consiste en sembrar la muestra en un medio líquido apropiado (medio de enriquecimiento). Luego se efectúa el aislamiento en medio sólido

2.3. Métodos de conservación de cultivos bacterianos

Existe una amplia variedad de técnicas para la preservación de cultivos bacterianos. Sin embargo puede resultar dificultoso elegir el método apropiado para la preservación de una determinada cepa, que no sólo asegure la viabilidad sino que también preserve el genotipo y en consecuencia, las características particulares de la misma. Preservar los cultivos sin cambios y con altos títulos de viabilidad facilita la reproducibilidad, tanto de procesos industriales como de investigaciones básicas o aplicadas. Durante el proceso de almacenamiento el cultivo está expuesto a la posibilidad de alteraciones genotípicas, que resulten en modificaciones de la actividad fisiológica o de la morfología. Los métodos más efectivos son aquellos que minimizan este riesgo no permitiendo el crecimiento celular y suprimiendo la actividad biológica.

2.3.1. Subcultivos o transferencias periódicas en medio fresco

Es un método tradicional de conservación. Los cultivos se mantienen vivos en tubos con medio nutritivo, del cual se transfieren periódicamente a un medio de cultivo fresco. Los intervalos de tiempo entre una transferencia y la siguiente varían con el tipo de microorganismo. Algunas especies requieren pasajes después de unos días en tanto que otras pueden durar semanas o meses.

Cuando se emplea este procedimiento hay que tener muy en cuenta el medio adecuado para cada especie y el lapso de tiempo en que se harán los repiques en medio fresco.

La frecuencia de las transferencias puede ser reducida disminuyendo el metabolismo celular almacenando a temperaturas bajas (4-8 °C) durante un lapso que va entre 15 a 60 días, utilizando medios de cultivos mínimos o cubriendo el cultivo con 1 o 2 cm de aceite mineral para uso medicinal estéril. El aceite impide la deshidratación y se inhibe el metabolismo y la velocidad de crecimiento del microorganismo al impedir que acceda al oxígeno del aire. Este método ha sido aplicado con resultados muy satisfactorios en hongos y levaduras, raramente en bacterias, aunque se tiene una reactivación lenta y el almacenamiento prolongado bajo condiciones adversas aumenta el riesgo de alteraciones y pérdida de viabilidad. Un aspecto muy importante en los subcultivos continuos es impedir el proceso de deshidratación del medio utilizando tapas con parafina o colocando varios tubos en bolsas de plástico selladas.

Ventaja

- es sencillo y fácil de realizar

Desventajas

- Pérdida de las características del cultivo, ya que las transferencias frecuentes incrementan la posibilidad de mutación de cada subcultivo.
- Contaminación que aparece con frecuencia.
- Pérdida del cultivo, esto es fácil de ver con organismos delicados y ocurre por razones no del todo específicas como variaciones en los medios, fluctuaciones de temperatura, etc.
- Alteraciones en el medio de cultivo, ocurren durante la estadía en la heladera, si ésta es prolongada se produce una gradual desecación del medio, lo que trae aparejado un aumento en la presión osmótica y variación de los nutrientes. Se puede solucionar en parte mediante el uso de un papel especial (Nesofilm, Parafilm, etc) para cubrir los tubos.

2.3.2. Suspensión de esporas en agua destilada

Este método consiste en guardar esporas libres de células vegetativas. La metodología es la siguiente: cultivos de 48 h en medio agarizado que favorezca la formación de esporas son resuspendidos con 1 ml de agua bidestilada estéril conteniendo 2 µg/ml de lisozima. Luego de incubar 30 min a 37 °C son calentados 10 min a 80 °C y lavados 2 o 3 veces con agua bidestilada estéril. Alícuotas de la suspensión de esporas se guardan en forma de precipitado a -20 °C. Para el trabajo diario, se resuspende una alícuota en agua bidestilada estéril y se conserva a 4 °C. Esporas tratadas de esta forma y almacenadas a -20 °C, se han preservado por varios años con altos niveles de viabilidad.

2.3.3. Suelo, arena o sílica gel

Consiste en inocular tierra, arena o sílica gel estériles con el cultivo a preservar y se somete a desecación bajo vacío. En general se utiliza para cepas de hongos; en bacterias se aplica en casos de excepción o cuando no se dispone de otros métodos.

2.3.4. Criopreservación

Implica congelar y almacenar suspensiones celulares, a temperaturas que varían de -100 a -273 °C. La metodología más aplicada es sumergir criotubos que contengan las muestras adicionadas de un crioprotector, previamente congeladas en forma gradual, en nitrógeno líquido a -196 °C, o en la fase de vapor inmediatamente arriba de la superficie, a temperaturas apenas superiores. Este método de preservación, aplicable tanto a microorganismos esporulados como no esporulados, aerobios o anaerobios, es considerado el más eficiente, siempre que se tengan los cuidados necesarios al precongelar la suspensión celular a preservar y al descongelar, en el momento de la recuperación del cultivo.

La metodología básica para minimizar la mayoría de los efectos no deseados consiste en:

- Obtener un cultivo en condiciones óptimas en fase exponencial media o tardía.

- Ajustar el título a $2-6 \times 10^6$ cél / ml y se dispone en criotubos estériles de polipropileno con tapa de cierre hermético que contienen glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO), para una concentración final de 5 %. Si se utilizan ampollas deben ser de borosilicato de paredes gruesas.
- Cerrar los criotubos y hacer una prueba de verificación de cerrado; esta verificación es esencial cuando se utilizan ampollas, para evitar la potencial explosión de las mismas al pasar del nitrógeno líquido a la temperatura ambiente para recuperar los cultivos.
- Para la mayoría de las cepas bacterianas se obtiene una adecuada tasa de congelamiento colocando los criotubos en un baño de hielo seco o refrigerador mecánico a -65°C por varias horas, para luego transferir las muestras a nitrógeno líquido (-196°C) o a los vapores cercanos a la superficie del líquido (-90°C).

Existen instrumentos programables para el congelamiento controlado de la suspensión celular, como así también, numerosas variaciones del método con diferentes tasas de enfriamiento y descongelamiento y el uso de diferentes crioprotectores que optimizan la técnica permitiendo la preservación de organismos exigentes.

Una vez que el cultivo ha sido congelado satisfactoriamente y almacenado en nitrógeno líquido el período de conservación puede ser **indefinido**, con una retención de hasta 95 % de viabilidad, debido a que a temperaturas menores de -139°C , toda el agua interna de la célula se congela, no ocurren más reacciones bioquímicas y el metabolismo se suspende completamente; además el proceso de cristalización se detiene y el organismo deja de estar sometido a cambios tanto de genotipo como físicos. El éxito de esta técnica depende de las etapas previa y posterior al almacenamiento a -196°C . En la **etapa previa**, el factor decisivo es la velocidad de congelamiento que determina el grado de deshidratación de la célula. Dado que la concentración de solutos y/o la formación de cristales contribuyen al daño celular, la tasa de enfriamiento no debe ser ni muy rápida ni demasiado lenta. En cuanto a la **etapa posterior** de recuperación de la muestra, se recomienda un descongelado lo más rápido posible, para evitar la recristalización del hielo durante el calentamiento, con una agitación suave que acelere el fundido del hielo.

Otro aspecto a tener en cuenta para minimizar los posibles daños causados por el congelamiento, es la adición a la suspensión celular de sustancias crioprotectoras no tóxicas, capaces de difundir al interior celular, uniéndose a los electrolitos que aumentan en concentración durante el congelamiento o a las moléculas de agua para retrasar el congelado. Los crioprotectores más comunes y efectivos para todo tipo de células son glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO).

Desventajas:

- Dificultad de transporte, dependencia de la provisión de nitrógeno y alto costo.
- Peligro al utilizar los tanques refrigerantes de nitrógeno debido a las posibles pérdidas del líquido, ya que por su alta capacidad de expansión pueden desalojar el aire de un cuarto pequeño.
- Daño que le producen a la célula los continuos descongelamientos cada vez que se extrae inóculo de la muestra (para minimizar este inconveniente se desarrolló un método para congelar suspensiones celulares sobre perlitas individuales sin necesidad de descongelar toda la muestra)

2.3.5. Liofilización

Es un proceso de secado bajo presión reducida, donde el vapor de agua es removido directamente de una suspensión de microorganismos congelada, por sublimación. Debido a la falta de actividad metabólica del cultivo preservado por secado-congelado éste es el método indicado para preservar la viabilidad de microorganismos por largo tiempo con precauciones mínimas de almacenamiento y/o transporte.

Ventajas

- Se puede trabajar con un número grande de muestras al mismo tiempo, como en el caso del empleo en la preparación de vacunas.
- El mantenimiento de un liofilizado es fácil ya que se puede mantener a temperatura ambiente aunque para una mayor longevidad deben almacenarse a baja temperatura (4 °C) y en oscuridad ya que hay evidencias de que la luz, sobre todo fluorescente, daña el material liofilizado.

Existen varios factores que influyen en la viabilidad de las células durante el proceso:

Tipo de organismo: Las células vegetativas son menos resistentes que las esporas y las bacterias Gram positivas sobreviven más a la liofilización que las Gram negativas.

Concentración celular: La sobrevivencia es directamente proporcional al título inicial de células, es recomendable una suspensión de células a liofilizar relativamente densa (en bacterias no formadoras de esporas título de 10¹⁰ cél/ml). Este efecto favorable estaría relacionado con la liberación de sustancias protectoras de las células lisadas.

Edad fisiológica de las células: aquellas en fase estacionaria de crecimiento son usualmente más resistentes.

Medio de suspensión del cultivo a liofilizar: por ejemplo: leche descremada diluída al 10 %, caldo nutritivo adicionado de inositol al 5 %, solución de sacarosa y peptona al 7 %, suero equino con 5 % de inositol, glutamato de sodio, etc.

Velocidad de congelamiento: Se recomienda un enfriamiento que promueva la formación de cristales pequeños, los que producirían menor daño celular que los de mayor tamaño.

Vacío en los frascos: Es importante porque de lo contrario la presencia de oxígeno en organismos secos es tóxica.

Los aparatos utilizados varían en complejidad, sin embargo se requiere un sistema relativamente simple consistente en una bomba de vacío de alta capacidad, un condensador o trampa de humedad a baja temperatura y una cámara con válvulas de distribución. Pequeños volúmenes de un cultivo denso, resuspendido en medio protector, se colocan en ampollas de liofilización y son sumergidas en un baño de hielo seco y etilenglicol 50 % a -40 °C para congelar la suspensión de células. Luego, se colocan los frascos con la muestra congelada en las bocas de entrada de la cámara de vacío y se produce la sublimación del agua.

Una vez completada la liofilización y para proteger el material secado del aire que produciría su deterioro, se sellan las ampollas "in situ". Para una mayor longevidad, los cultivos liofilizados se almacenan a baja temperatura (4 °C), en oscuridad, ya que existen evidencias que la luz, sobre todo fluorescente, daña el material liofilizado. El porcentaje de humedad residual debe oscilar en 1 %, ya que porcentajes menores podrían provocar muerte celular o mutaciones por daño al ADN.

Existen otros métodos de preservación de cultivos como: secado en disco de gelatina, secado-líquido o "L - Drying", tiras o discos de papel, etc.

Dado que todos los métodos de preservación presentan riesgos de obtener resultados no deseados, la elección del método apropiado para un cultivo determinado dependerá del tipo de microorganismo; la necesidad de estabilidad de caracteres y / o sobrevivencia; la disponibilidad de equipamiento, mano de obra y apoyo financiero; el clima y la posibilidad de distribución y transporte.

2.4. Parte práctica

2.4.1. Objetivos:

1. Sembrar diferentes muestras en medios de cultivos líquidos y sólidos.
2. Adquirir nociones básicas sobre métodos de conservación microbiana

2.4.2. Técnicas de siembra

Por estrías

Materiales

- Medio agarizado en tubo de ensayo en pico de flauta
- Ansa en anillo

Procedimiento

Esterilizar el ansa , enfriar y tomar el inoculo.

Sembrar realizando estrías lo más juntas posibles sobre la superficie del medio de cultivo sin dañarlo, comenzando en la porción mas profunda del tubo.

Por punción

Materiales

- Medio agarizado en tubo
- Ansa recta

Procedimiento

Esterilizar y enfriar el ansa, tomar una pequeña porción de inóculo e introducir en el seno del medio de cultivo bien profundo sin tocar el fondo.

Retirar el ansa por el mismo lugar donde fue introducida, de modo que la siembra quede en una sola línea.

Nota: para algunas pruebas bioquímicas es necesario sembrar por punción un medio de cultivo en pico de flauta y además por estrías en superficie (por ej.: TSI)

Aislamiento por agotamiento

Materiales

- Medio agarizado en placa de Petri
- Ansa en anillo

Procedimiento

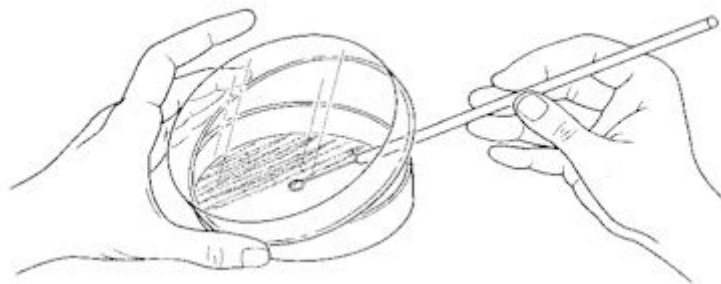
Dividir la superficie del medio de cultivo (con lápiz marcador por el lado externo de la placa de Petri) en 3-4 sectores. (Figura 2.4.1)

Cargar el ansa y sembrar mediante estrías en cada sector sin recargar el ansa.

Una vez sembrada la caja se incuba invertida.

Después de la incubación observar y estudiar las colonias aisladas.

Figura 2.4.1: Siembra en placa de Petri por método de estrías. *Extraído de Microbes in action 4ªEd. A Laboratory Manual of Microbiology. Seeley HW, Vandemark PJ, Lee JJ. 1991.*



Aislamiento por placa vertida

Materiales

- Un tubo con 12 a 15 ml un medio agarizado
- Pipeta estéril
- Caja de Petri estéril

Procedimiento

Rotular la caja de Petri y colocar 1 ml del material en suspensión.

Volcar el medio agarizado previamente fundido y enfriado a 45-50°C. Mezclar realizando suaves movimientos de rotación.

Incubar en forma invertida una vez que haya solidificado.

Si se sospecha que el material posee una elevada población microbiana, realizar diluciones de la muestra.

2.5. Bibliografía

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. 2000.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN y Ginsberg, HS. Tratado de Microbiología. ED. Salvat. 4 Ed.1997.

Jawet Y, Melnick Adelberg, Brock MD, Butel YS, Morse SA. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. 17 Edición. 2002.

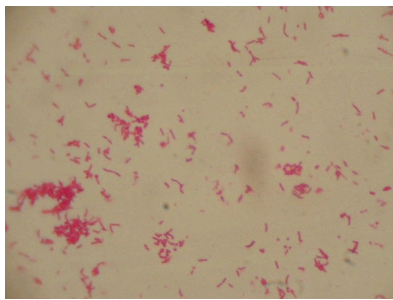
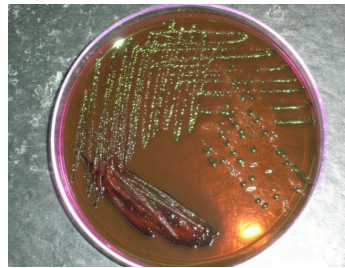
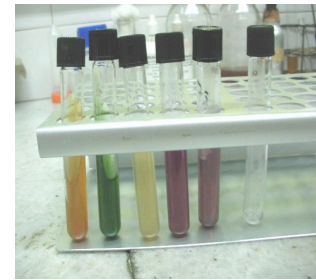
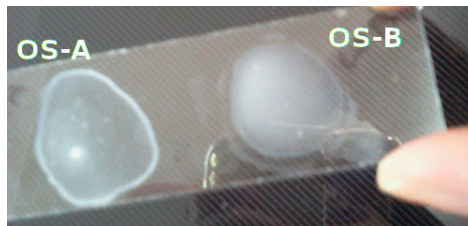
Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Eds Jennie C. Hunter-Cevera and Angela Belt. Academic Press. 1996.

3 Características culturales del crecimiento. Identificación fenotípica.

3.1. Introducción

Un requisito indispensable para establecer similitudes y diferencias entre los microorganismos es un completo conocimiento de las características de los mismos, las cuales permiten establecer la existencia de grupos diferentes e identificar especies dentro de cada grupo. Las principales características incluyen:

1. Micromorfológicas (Figura 3.1.1 a)
 - a) Forma celular y agrupamiento
 - b) Estructura celular (presencia o no de flagelos, esporas, cápsula)
 - c) Coloraciones (Gram, vital, esporas, ácido-alcohol resistencia)
2. Nutricionales
 - a) Crecimiento en la luz (medio inorgánico)
 - b) Crecimiento en la oscuridad (medio inorgánico, medio orgánico)
3. Culturales (Figura 3.1.1 b)
 - a) Colonias
 - b) Cultivo por picadura
 - c) Cultivo en caldo
4. Bioquímicas (Figura 3.1.1 c)
 - a) Fermentación de carbohidratos
 - b) Producción de H_2 y SH_2
 - c) Licuefacción de la gelatina
5. Antigénicas (Figura 3.1.1 d)
 - a) Aglutinación
 - b) Precipitación
6. Patogenicidad (Figura 3.1.1 e)
 - a) Animales
 - b) Vegetales

Figura 3.1.1: Características que permiten la identificación microbiana.**(a)** Micromorfología**(b)** Características culturales**(c)** Pruebas bioquímicas**(d)** Características antigénicas**(e)** Propiedades patogénicas

3.2. Características de los cultivos microbianos

El conocimiento de las características culturales del crecimiento bacteriano en determinados medios de cultivo es importante para la identificación de un cultivo desconocido. Con el objeto de determinar las características del crecimiento de un cultivo puro es muy común observar los siguientes tipos de cultivos:

3.2.1. Colonias en placa de agar

Podemos observar:

Tamaño: Las colonias varían en tamaño desde las extremadamente pequeñas, midiendo solo una fracción de milímetro de diámetro, a grandes colonias que miden entre 5 y 10 mm de diámetro. Muchas bacterias forman una colonia de tamaño limitado independientemente del período de incubación. Otras, tales como *Pseudomonas* y *Proteus* se disponen en toda la superficie.

Margen: la zona periférica de las colonias bacterianas presenta diferentes modelos dependiendo de las especies. Pueden ser circulares perfectas como el borde de una gota de agua, o mostrar muchas irregularidades (Figura 3.2.1).

Elevación: pueden ser chatas o elevadas

Cromogénesis o pigmentación: pueden ser coloreadas o no (no pigmentadas o rojas, amarillas, marrones o violeta, etc.)

Características ópticas: las colonias pueden ser opacas, translúcidas u opalescentes.

3.2.2. Desarrollo en agar inclinado

Cantidad: escaso, moderado, abundante

Figura 3.2.1: Características morfológicas de las colonias microbianas. *Extraído de Seeley HW Jr, Van Demark PJ. Manual de laboratorio para microbiología. Ed. Blume. Madrid, España, 1973.*



Margen de crecimiento: uniforme o irregular

Consistencia del crecimiento: butiroso, viscoso, seco y fácilmente removible.

Cromogénesis o pigmentación: similar a las descritas para las colonias.

3.2.3. Crecimiento en caldo nutritivo

Cantidad: escaso, moderado o abundante.

Distribución del crecimiento en el caldo: uniformemente distribuido, crecimiento en la superficie del caldo como una película o acumulado en el fondo como sedimento, el cual puede ser granular o viscoso.

Olor: pútrido, a frutas, aromático o despreciable.

3.3. Coloraciones

La observación de los microorganismos se puede realizar:

- Teñidos con colorantes
- En fresco o vivos sin teñir: se evalúa movilidad

Los microorganismos son químicamente muy diferentes del medio que los rodea. Esta diferencia es la que permite distinguir las bacterias por tinción pues generalmente el colorante reacciona con la célula bacteriana pero no con el medio externo.

Algunas de las ventajas que presenta la observación de los microorganismos coloreados son:

- Proporciona el contraste suficiente entre el microorganismo y el medio que los rodea, permitiendo diferenciar varios tipos morfológicos.
- Permite el estudio de estructuras de la célula bacteriana.
- Se puede obtener mayores amplificaciones con el empleo del objetivo de inmersión del microscopio.

3.3.1. ¿Que es un colorante?

Los colorantes son, generalmente, sales en las que uno de sus iones tiene color. Una sal es un compuesto formado por un ion cargado positivamente y un ion cargado negativamente. Ej. la sal cloruro de metileno, donde el color del colorante reside en el ion azul de metileno (AM), cargado positivamente.



Los colorantes se pueden dividir en 2 grupos: básicos y ácidos. Si el colorante reside en el ion positivo, se dice que es un colorante **básico**. Si el color reside en el ion cargado negativamente, se dice que es un colorante **ácido**.

3.3.2. Pasos a seguir para realizar una coloración

Preparado del material que se va a colorear se puede llevar a cabo realizando alguna de las siguientes técnicas:

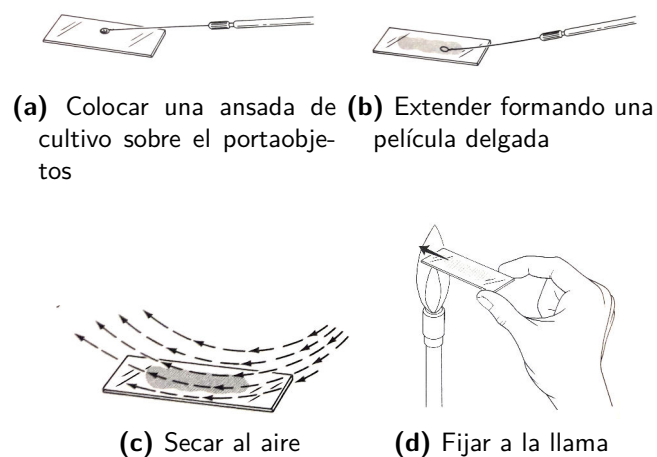
Frotis: se realiza colocando una ansada de cultivo líquido en el centro de un portaobjeto bien limpio¹. Si el preparado se debe efectuar desde un cultivo en medio sólido, colocar previamente sobre el portaobjeto una gota de solución fisiológica estéril, y sobre ella emulsionar perfectamente el inóculo, de manera de lograr una película delgada y uniforme. Figura 3.3.1

¹Los portaobjetos utilizados para coloraciones deben estar perfectamente limpios y desengrasados, para eso se los mantiene en alcohol de 95° hasta el momento de su uso. Deben ser en lo posible nuevos y no presentar rayaduras que puedan confundir la observación.

Extendido: es particularmente útil en en materiales con gran cantidad de células. Colocar en un extremo del portaobjetos una gota del material a colorear (suspensión bacteriana en solución fisiológica o algún colorante, sangre u otros materiales biológicos). Con el pulgar y el índice de la mano izquierda se sujeta el portaobjetos desde un extremo y con el pulgar y el índice de la mano derecha se sujeta por el extremo un segundo portaobjetos contra la superficie del primero, con un ángulo de 30-40°. La gota quedará en el ángulo de los 2 portaobjetos. Se empuja lentamente el "porta extensor" en la dirección opuesta a lo largo del otro, de manera que la gota fluya por detrás del borde del primero. Un buen extendido tiene una zona gruesa y una más delgada, con una transición gradual entre ambas. El aspecto debe ser liso y nivelado.

Impronta: con un hisopo se presiona la zona que se desea estudiar (por ej. boca, encías, garganta, superficies inertes, etc.) y luego se presiona suavemente sobre el portaobjetos. Este método se emplea para observar microscópicamente muestras como paso previo al cultivo.

Figura 3.3.1: Preparación del frotis para colorear. *Extraído de Microbes in action 4ªEd. A Laboratory Manual of Microbiology. Seeley HW, Vandemark PJ, Lee JJ. 1991.*



Secado

Cualquiera sea el método seguido en la preparación, el segundo paso a seguir es el secado. Este se puede realizar secando el preparado al aire, a temperatura ambiente, o bien manteniéndolo encima de la llama del mechero.

Fijación

El calor es el agente fijador más comúnmente empleado, también se pueden emplear algunos agentes como el alcohol y varios compuestos químicos.

Para fijar el preparado utilizando el calor, se lo toma desde un extremo, y se lo pasa tres veces rápidamente por la llama del mechero. Dejarlo enfriar antes de proceder a la fijación. La capa de células debe estar siempre hacia arriba cuando se fija el preparado.

El propósito de la fijación es matar a los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherirla al portaobjetos. Si no se fijase la capa de células se lavaría durante el proceso de tinción.

3.3.3. Mecanismo de coloración

Coloración directa

La mayor parte de las proteínas bacterianas tienen un punto isoeléctrico entre pH 2 y pH 5, esto nos indica que, la célula bacteriana tiene una carga negativa neta cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad (pH 7), que es lo que generalmente ocurre. La bacteria cargada negativamente se combina con el ion cargado positivamente (por ej. El ion azul de metileno) con lo cual se tiñe la bacteria. Las diferencias en la carga dan lugar a una afinidad entre el colorante básico y la célula bacteriana. Los colorantes básicos más comúnmente empleados son: fucsina, azul de metileno, cristal violeta y fucsina fenicada. Estos se diferencian en la proporción y rapidez en que tiñen a la célula bacteriana.

Coloración indirecta

La eosina es un ejemplo de colorante ácido y se emplea como sal soluble eosinato sódico que se ioniza en eosinato⁻ + Na⁺. Como la capacidad colorante reside en el ion cargado negativamente, este no tendrá afinidad por la célula bacteriana cargada también negativamente. En lugar de ello, el colorante se deposita alrededor de la célula, quedando ésta incolora y el medio que la rodea coloreado.

Coloración vital

Colocar sobre un portaobjetos una gota de colorante (ej.: solución acuosa de cristal violeta 1 / 5000).

Con un ansa tomar una pequeña cantidad de cultivo y emulsionarlo perfectamente con la gota del colorante.

Cubrir suavemente la gota con un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas de aire.

Examinar con el objetivo de inmersión (100X). Las bacterias aparecen coloreadas sobre un fondo claro.

Observación en fresco

Colocar una gota de cultivo líquido o emulsionar el microorganismo en estudio en una gota de SF con un ansa, en el centro de un portaobjetos.

Cubrir con un cubreobjetos y observar (40X)

Coloraciones diferenciales

Los microorganismos difieren químicamente y físicamente entre sí y por eso reaccionan de una manera distinta frente a un determinado proceso de tinción. Este es el fundamento de las coloraciones diferenciales.

En la identificación de una especie microbiana se emplean, en primer lugar la coloración de Gram que permite conocer formas y disposición celular y presencia de estructuras tales como esporas. Ejemplos: coloración de Gram y de Ziehl-Neelsen.

Coloración de Gram

Reactivos:

a) Cristal Violeta o Violeta de Genciana

Cristal violeta 10 g
Fenol al 50 % en alcohol 50 ml
Alcohol puro 75 ml
Dejar madurar en estufa a 37 °C durante una semana y
agregar luego:
Agua destilada 1000 ml
Filtrar antes de usar.

b) Lugol

Yodo 5 g
KI 10 g
Agua destilada 1000 ml

c) Fucsina de Ziehl

Fucsina básica 10 g
Fenol 50 % en alcohol 100 ml
Alcohol 50 ml
Dejar de madurar en estufa a 37 °C durante una semana
y luego agregar:
Agua destilada 1000 ml
Filtrar antes de usar.

Fucsina de Ziehl diluida 1/10: de la fórmula anterior, hacer una dilución 1/10 en agua destilada.

Técnica:

1. Hacer el frotis. Secar a la llama. Fijarlo.
2. Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar 2 minutos.
3. Escurrir el colorante y tratar con lugol dos veces consecutivas durante 30 seg o una vez durante 1 min. Volcar.
4. Decolorar con alcohol o alcohol - acetona.
5. Lavar con agua corriente y efectuar la coloración de fondo con la fucsina 1 / 10. Dejar actuar 1 min.
6. Lavar. Secar. Observar por inmersión.
7. Las bacterias Gram positivas se observan violetas y las Gram negativas rojas.

Las 4 soluciones empleadas son:

- Colorante básico (cristal violeta): el color reside en el ion cargado positivamente.
- Mordiente (lugol): es una sustancia que aumenta la afinidad o atracción entre la célula y el colorante, ayudando a que se fije el colorante a la célula.
- Agente decolorante (alcohol o alcohol-acetona): Sustancia que retira el colorante de la célula teñida.
- Contraste (fucsina 1/10): es un colorante de color distinto al colorante utilizado en primer lugar. La misión del contraste es dar a las células decoloradas un color diferente al de las células que no se han decolorado.

Etapas de coloración	Resultados	
	Gram (+)	Gram (-)
Tinción inicial (cristal violeta)	Se tiñen violeta	Se tiñen violeta
Mordiente (lugol)	Permanecen violeta	Permanecen violeta
Decoloración (ol o ol-acetona)	Permanecen violeta	Se decoloran
Contraste (fucsina 1 / 10)	Permanecen violeta	Se tiñen de rojo

Coloración de estructuras

Coloración de esporas. Método de Moeller

Reactivos:

- Ácido crómico: solución al 5 % (mordiente)
- Fucsina fenicada de Ziehl
- Ácido sulfúrico: solución al 5 % (decolorante)
- Azul de metileno: azul de metileno de Ziehl- Neelsen

Técnica:

- Realizar el frotis. Secarlo.
- Fijarlo con alcohol absoluto, escurrir el alcohol y el resto arderlo.
- Tratar con ácido crómico 5 min. Lavar.
- Cubrir con fucsina fenicada de Ziehl y calentar con hisopo encendido, manteniendo la emisión de vapores 10 min.
- Decolorar con ácido sulfúrico al 5 %.
- Completar la decoloración con alcohol.
- Lavar y efectuar la coloración de fondo con azul de metileno diluido durante 1 min.
- Lavar. Secar. Observar por inmersión
- Las bacterias se ven azules y las esporas rojas.

3.4. Metabolismo microbiano

Todas las actividades de la célula bacteriana se realizan a través de enzimas. Realizando una serie de pruebas, denominadas pruebas bioquímicas, podemos establecer un patrón de actividad, el cual nos refleja la composición enzimática del microorganismo, y además nos puede ayudar en la identificación y diferenciación de un microorganismo dado entre otras especies estrechamente relacionadas.

3.4.1. Movilidad

Colocar en el centro de un portaobjeto limpio una ansada de cultivo joven (18 a 24 h) en caldo nutritivo. Cubrir la gota con un cubre objetos evitando formar burbujas de aire.

Colocar la preparación sobre la platina del microscopio, enfocar con objetivo de 40x Observar si las bacterias presentan verdadero movimiento, diferenciándolo del browniano por el agregado de una gotita de formol por capilaridad.

3.4.2. Prueba del Indol

Agua peptonada	Medio: SIM
Peptona 1 g	Tripteína 20,0 g
NaCl 0,5 g	Peptona 6,1 g
A.D. csp 100 ml	Sulfato de hierro y amonio 0,2 g
	Tiosulfato de sodio 0,2 g
	Agar 3,5 g
	A.D. csp 1000 ml
	pH final: 7,3 ± 0,2

Es un medio líquido destinado a verificar la producción de indol

Medio semisólido que además, permite observar la movilidad y la formación de SH₂ del microorganismo en estudio

Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamado triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs (revelador) para dar un compuesto de color rojo.

Además en el medio SIM las cepas móviles pueden apreciarse en este medio por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Siembra e incubación

Por punción profunda con ansa recta (no usar ansa en anillo). Incubar 24 h a 35°C. Reconocer la producción de indol añadiendo unas gotas del reactivo de Kovacs:

Reactivo de Kovacs:

Alcohol amílico 150 ml
p- dimetilaminobenzaldehído 2 g
HCl (c) 40 ml

Interpretación de los resultados

Cepas		
movilidad	+	Producen turbidez del medio alrededor de la punción de siembra
	-	La línea de punción se observa nítida
SH ₂	+	Ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de siembra
	-	Sin cambio de color
Indol	+	Al ser reveladas con Kovacs se forma anillo rojo en la superficie
	-	Sin cambio de color

3.4.3. Prueba de Voges-Proskauer (VP) y Rojo de Metilo (RM)

Para la realización de estas pruebas se utiliza el medio de Clark y Lubs, que es una solución de peptona glucosada:

K ₂ HPO ₄	5 g
Peptona.....	5 g
Glucosa.....	5 g
A.D. c.s.p.....	1000 ml
Ajustar el pH a 7-7,2	

Esterilizar la glucosa por separado. Sembrar. Incubar a 37 °C durante 48- 96 h.

VP: a una alícuota de cultivo adicionar 0,1 a 0,2 ml de KOH al 40 %, agitar y añadir 0,2 ml de solución de alfa naftol. Una reacción positiva se manifiesta por el desarrollo de color violeta-rojizo. Esta reacción depende de la producción a partir de glucosa de acetil-carbinol (acetoína), que es un precursor de 2,2-butilenglicol. En presencia de oxígeno atmosférico y álcali, la acetoína es oxidada en diacetilo, y este reacciona con el reactivo colorante alfa naftol para dar el color violáceo de la reacción.

Reactivos:

1. alfa naftol.....	5 g
alcohol 95°.....	1000 ml
2. KOH.....	40 g
creatina.....	0,3 g
A.D.....	100 ml

RM: a la otra porción de cultivo agregarle 2-3 gotas de la solución de rojo de metilo. La aparición de color rojo indica reacción positiva, mientras que color amarillo indica reacción negativa. La finalidad es comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. El rojo de metilo es un indicador de pH que vira al rojo cuando el pH del medio es igual a 4,2 o menor.

Reactivo:

Rojo de metilo.....	0,1 g
Alcohol.....	300 ml
A.D.....	200 ml

3.4.4. Prueba de utilización del citrato

Medio citratado de Simmons:

MgSO ₄	0,2 g
NaCl.....	5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Citrato de Na.....	2 g
Azul de bromotimol.....	2 g
A.D.....	1000 ml
Agar.....	15 g

Colocar en tubos de hemólisis 3 ml por tubo. Esterilizar. Inclinar. Inocular con ansa en estrías. Incubar 18 a 24 h a 37 °C. El medio es de color verde, si el microorganismo usa el citrato como única fuente de carbono, el medio vira al azul por liberación de NaOH.

Las cuatro pruebas antes mencionadas (**IMViC**) son un conjunto de reacciones empleadas comúnmente en la identificación de miembros de la familia *bactlikegenus=Enterobacteriaceae*.

I Prueba del Indol

M Prueba de Rojo de Metilo

V Prueba de Voges-Proskauer

C Prueba de utilización de Citrato

3.4.5. Prueba de la catalasa

Principio

Detectar la presencia de la enzima catalasa. Esta enzima se encuentra en numerosas bacterias y cataliza la ruptura del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con liberación de oxígeno.

Método del portaobjetos

- Con el ansa en anillo recoger el centro de una colonia pura de 18-24 h y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 3 % sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

Resultados

+	Burbujas
-	Sin burbujas

Características especiales

La catalasa se encuentra en muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas. La principal excepción es *Streptococcus*. La catalasa no está presente en anaerobios.

Precauciones en la interpretación

Es importante tener en cuenta que si la colonia bacteriana proviene de un agar sangre pueden originarse falsos positivos por la presencia de glóbulos rojos que contienen catalasa. Los cultivos viejos pueden perder la actividad catalasa, resultando en posibles falsos negativos.

3.5. Manejo del Manual Bergey

El primer Manual Bergey de Bacteriología Determinativa fue publicado en 1923, bajo el auspicio de la Sociedad Americana de Bacteriólogos, siendo su presidente David Bergey. Actualmente la sociedad encargada de la publicación del manual, es una organización sin fines de lucro, siendo los ingresos que percibe usados solamente con el propósito de preparar, editar y publicar sucesivas ediciones del manual y publicaciones suplementarias.

La segunda edición consta de 5 volúmenes divididos en:

- Volumen 1(2001): Las Arqueas, bacterias fototróficas y ramificadas.
- Volumen 2 (2005): Las proteobacterias
- Volumen 3 (2009): Firmicutes
- Volumen 4 (2010): Los bacteroides, espiroquetas, tenericutas, acidobacteria, fibrobacterias, fusiformes, verrucomicrobios, planctomicetos y clamidias y otros
- Volumen 5 (2011): Las actinobacterias.

El objetivo del Manual dividido en volúmenes es que cada parte puede ser actualizada y publicada mucho mas rápidamente que si se tratase del manual completo. Permite además, que el microbiólogo acceda al volumen de su interés exclusivamente.

La última edición amplía el objetivo original e incluye más información de importancia para la bacteriología sistemática, ya que trata la ecología, enriquecimiento, aislamiento y descripción de especies y sus características determinantes, mantenimiento y preservación.

3.5.1. Uso del Manual

El principal objetivo del manual es asistir a la identificación de las bacterias, pero además el otro objetivo es indicar las relaciones que existen entre las distintas clases de bacterias. Los métodos de biología molecular hacen posible intentar una clasificación de las bacterias basadas en sus relaciones mutuas.

3.5.2. Secciones

El manual presenta varias secciones basadas en unos pocos criterios determinados. Cada sección tiene un nombre corriente (o vernáculo). Todos los géneros aceptados han sido ubicados en lo que parece ser la sección mas apropiada. Sin embargo, algunos géneros presentan dificultades. Ej. género *Gardnerella* , *Butyrivibrio* , etc.

3.6. Parte práctica

3.6.1. Objetivos:

1. Observar el crecimiento microbiano: directamente y por microscopia con coloraciones
2. Determinar el tipo de metabolismo microbiano mediante pruebas bioquímicas
3. Comprender el manejo de Manual Bergeys

3.6.2. Procedimiento

1. Observar las colonias desarrolladas en las siembras del trabajo práctico anterior, según lo expuesto en sec. 3.2
2. Elegir una de las colonias mencionadas y realizar con ella un frotis y colorear con Gram siguiendo las intrucciones de sec. 3.3
3. Luego, a partir de la misma colonia, inocular una batería de pruebas bioquímicas (TSI, SIM, citrato, VP - RM) según lo indicado en sec. 3.4
4. Una vez concluído el tiempo de incubación de las pruebas, revelarlas e identificar el microorganismo con la ayuda del Manual Bergeys

3.7. Bibliografía

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. (2000)

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN y Ginsberg, HS. Tratado de Microbiología. ED. Salvat. 4 Ed. (1997)

Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins ED. (1987)

McFadin YF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. (2003)

Forbes BA, Sahm DF, Neissfeld AJ, Trevino A. Diagnóstico Microbiológico Bailey y Scott. Ed. Médica Panamericana.(2004)

4 Identificación genotípica de microorganismos

4.1. Introducción

La biología molecular es una disciplina relativamente nueva que tuvo sus orígenes en los años 30s y los 40s, y fue institucionalizada en los años 50s y los 60s con el descubrimiento de la doble hélice del ADN por James Watson y Francis Crick. Con la estructura del ADN a disposición y partiendo de la base el gen era una molécula informativa, la biología molecular cambió su enfoque ya que permitió dilucidar los mecanismos de replicación y la función genética, claves para entender el papel de los genes en la herencia. La secuencia lineal de las bases de los ácidos nucleicos a lo largo de una hebra de ADN proporciona la información codificada para establecer el orden de aminoácidos en las proteínas.

4.2. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares actuales han sido desarrolladas, en solo pocos años de investigación básica en muchos campos de la ciencia, de tal manera que en los últimos años, estas técnicas han surgido como los métodos para el análisis y tipificación de los aislamientos bacterianos. Ellas son la huella dactilar de plásmidos (PF: plasmid fingerprint), el análisis de endonucleasas de restricción de ADN de plásmidos (REA: restriction endonuclease analysis); el Polimorfismo de largos fragmentos de restricción (RFLP: restriction fragment length polymorphism) mediante el corte de ADN cromosómico con endonucleasas de restricción y electroforesis convencional para el análisis del patrón de bandas generado. La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE: pulsed field gel electrophoresis); y el AP-PCR (arbitrarily primers - polymerase chain reaction) y otras técnicas relacionadas con la tipificación basada en la amplificación de ácidos nucleicos.

La tipificación puede proporcionar información sobre la distribución de tipos microbianos en poblaciones humanas y animales, lo cual puede ser aplicado en programas de vigilancia a nivel local, regional, nacional o mundial. El monitoreo de marcadores asociados con la patogenicidad, inmunogenicidad o resistencia a medicamentos, son de especial interés por ejemplo en la vigilancia de enfermedades controlando la posible aparición de nuevas cepas epidémicas con el objetivo de prevenir posibles brotes. Asimismo, puede ayudar en la planificación de servicios de salud y en el desarrollo de vacunas y programas de inmunización.

En síntesis, estas técnicas también pueden ser usadas en estudios clínicos para conocer los patrones de colonización y para la identificación de fuentes de transmisión de microorganismos infecciosos, contribuyendo al conocimiento de la epidemiología y patogénesis de los microorganismos lo que permite el desarrollo de estrategias de prevención de enfermedades.

4.2.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR: Polymerase chain reaction)

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza comúnmente en los laboratorios de investigación médicos y biológicos para amplificar (crear copias múltiples) el ADN, sin utilizar un organismo vivo, tal como *E. coli* o una levadura. Asimismo, la PCR se emplea en la detección de enfermedades hereditarias, la identificación de huellas digitales genéticas, diagnóstico clínico, análisis forense del ADN, detección de patógenos en el hombre, animales, plantas, y alimentos, e investigación en biología molecular.

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis, al cual le fue otorgado el premio Nobel en química en octubre de 1993 por este logro. La idea de Mullis fue la de desarrollar un proceso a través del cual el ADN se pudiera multiplicar artificialmente a través de ciclos repetidos llevados a cabo por una enzima llamada ADN - Polimerasa.

La ADN - Polimerasa se produce naturalmente en los organismos vivos y permite duplicar el ADN cuando las células se dividen. Trabaja uniéndose a una sola hebra de ADN, creando una hebra complementaria.

El proceso original de PCR actualmente ha sido mejorado mediante el uso de la ADN - Polimerasa que procede de una bacteria termofílica *Thermophylus aquaticus* que vive en aguas termales a temperaturas superiores de 110 °C. La ADN - Polimerasa o Taq polimerasa tomada de estos organismos es termoestable (estable a altas temperaturas). Una desventaja de la Taq es que incurre a veces en equivocaciones al copiar el ADN, conduciendo a mutaciones (errores) en la secuencia del ADN.

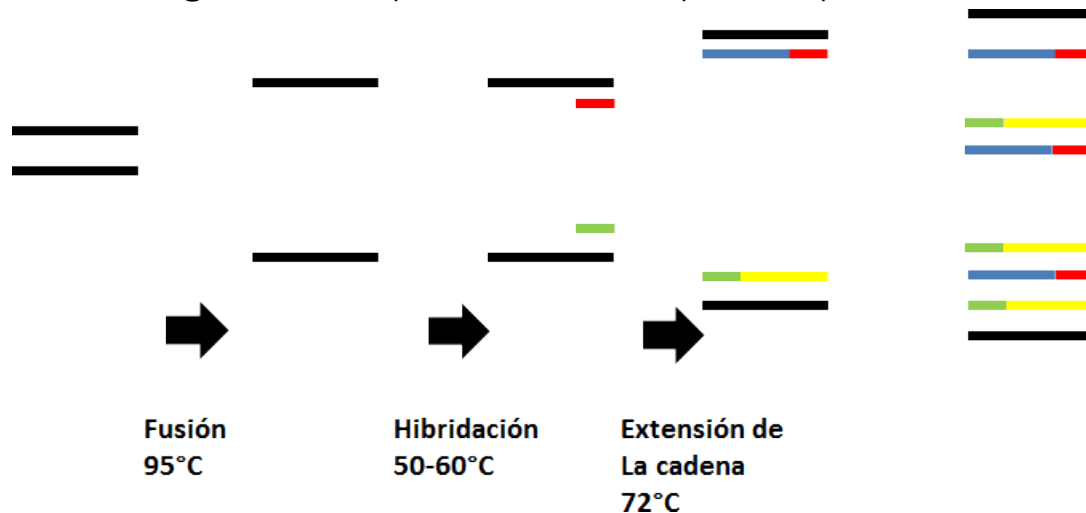
La PCR que ha sido utilizada por varios años para la detección directa de diferentes agentes infecciosos en muestras clínicas, actualmente es utilizada como una herramienta de tipificación. La ventaja de la PCR es su habilidad para producir literalmente millones de copias de un segmento de ADN particular con alta fidelidad en un tiempo de 3 a 4 horas.

El procedimiento requiere un molde de ADN que puede estar presente en la muestra en pequeñas cantidades; dos oligonucleótidos (primers) que flanquean las secuencias del molde de ADN que va a ser amplificado y una ADN - polimerasa estable al calentamiento.

Un ensayo típico de PCR requiere aproximadamente de 2,5 - 3 horas para completar 30 ciclos, donde cada ciclo consiste de una fase de desnaturalización, en donde la doble hebra de ADN es fundida en hebras únicas; una fase de alineación, en donde los primers se unen a las secuencias blanco en las hebras separadas; y una fase de extensión, en donde la síntesis de ADN procede de los primers a partir de cada hebra de la plantilla de ADN, generando dos nuevas copias de la doble hebra de la plantilla original. Después de cada 30 ciclos, una sola copia inicial de la plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a 1 billón de copias. Ver Figura 4.2.1.

Diversos factores influyen la validez de los resultados obtenidos por PCR, incluyendo la presencia de componentes inhibitorios, la calidad del ADN, y la falta de optimización de los componentes de la reacción o de las condiciones de temperatura de los ciclos. Un factor poco conocido es el funcionamiento subóptimo de los termocicladores, a los que podrían atribuirse también la variación de los resultados en la PCR.

Todos estos factores pueden comprometer la especificidad y sensibilidad de la reacción, pudiendo llevar a resultados falsos-negativos, falsos-positivos, o no reproducibles. Por lo tanto, el uso válido de esta técnica es fundamental para mantener la calidad de las bases de datos de ADN producidas.

Figura 4.2.1: Esquema de ciclos de amplificación por PCR.

4.2.2. Huella Dactilar de Plásmidos (PF)

La huella dactilar de plásmidos fue la primera técnica molecular utilizada como una herramienta de tipificación. Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico que están presentes en muchos aislamientos clínicos y pueden ser identificados por simples procedimientos de lisis de células seguidos de electroforesis en gel de los lisados. El número y tamaño de los plásmidos presentes es utilizado como base para la identificación de cepas. Esta técnica de tipificación de cepas ha sido utilizada con éxito en el análisis de brotes de infecciones nosocomiales y en infecciones adquiridas en comunidad causadas por una variedad de especies de bacterias gram-negativas. En general esta técnica es más utilizada para estudios epidemiológicos limitados en tiempo y espacio complementando otras técnicas como la PFGE, para diferenciar aislamientos que están relacionados genotípicamente pero que están separados epidemiológicamente por cortos periodos de tiempo.

4.2.3. Análisis del Polimorfismo de Largos Fragmentos de Restricción (RFLP)

Una de las técnicas nuevas y más promisorias es el RFLP desarrollado por Keygene BV, Wageningen, de Nueva Zelanda. Es un método con alto poder de discriminación y reproducibilidad y ha sido utilizado para plantas y mapeo genético animal, diagnósticos clínicos, estudios filogenéticos, y tipificación de bacterias.

Está basada en la amplificación por PCR de una secuencia, digestión enzimática y comparación de los fragmentos de restricción genómica resultantes. Para el análisis de RFLP solamente se necesita una pequeña cantidad de ADN genómico purificado. La técnica tiene un alto poder discriminatorio y da muy buena reproducibilidad en el patrón de bandas para un amplio rango de bacterias patógenas tanto Gram positivas como negativas.

La técnica puede ser utilizada para ADNs de cualquier origen o complejidad y comprende cuatro pasos: 1) Obtención de ADN total; 2) Amplificación de cierta región del mismo; 3) Corte del ADN amplificado con enzimas de restricción; 4) Observación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa.

El ADN de un individuo se extrae y se purifica, se amplifica por PCR, luego se trata con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes.

Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular.

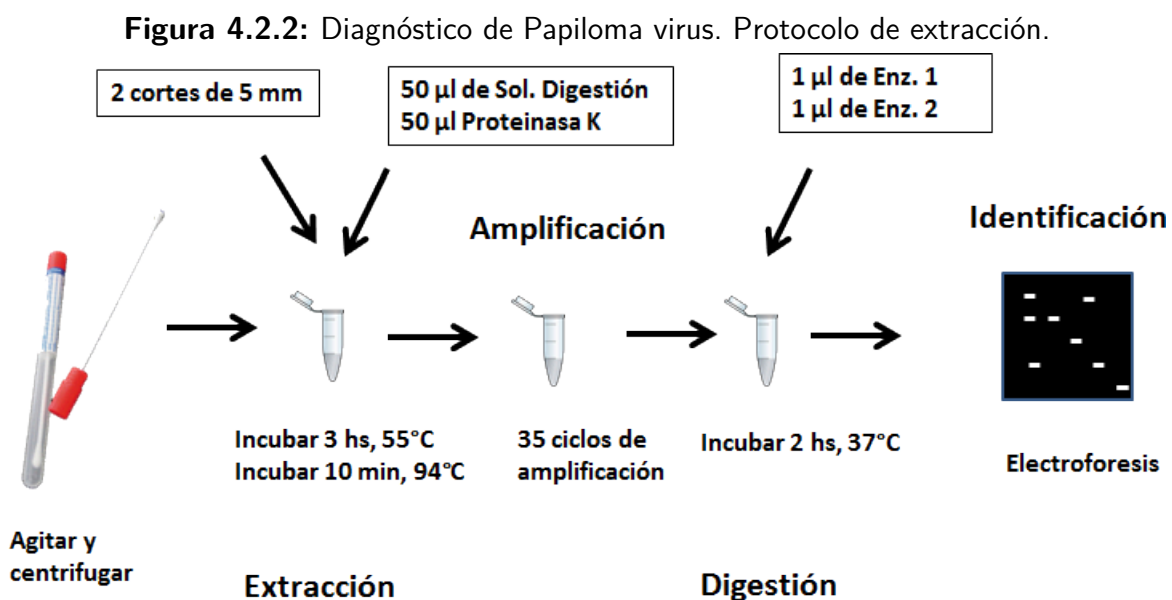
El análisis RFLP es útil en la identificación de muestras recuperadas de la escena de un crimen, en pruebas de paternidad y en el estudio de la biodiversidad en poblaciones animales.

Ejemplo 1: Diagnóstico de Papiloma virus

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el virus más comúnmente transmitido por vía sexual. De acuerdo con los reportes científicos, se estima que el 80 % de las personas con vida sexual activa tienen contacto con el VPH y aunque la mayoría lo elimina de forma natural, el 1 % tiene riesgo de desarrollar un tumor maligno. La alta incidencia del cáncer cervicouterino y displasias, así como la presencia de condilomas y trastornos de la piel y su asociación con infección del Virus de Papiloma Humano requiere de métodos diagnósticos más confiables.

Existen de 100 a 120 tipos de VPH registrados en el mundo, de los cuales 40 atacan el tracto genital y de estos, 15 son de alto riesgo para el desarrollo del cáncer ya que están asociados a un 99 % de los casos de tumores en el cérvix.

Se ha comprobado que los VPH tipo 16 y 18 son responsables del 70 % de los tumores malignos. Mientras que el VPH tipo 6 ocasiona del 75 al 80 % y el tipo 11 del 10 al 15 % de los casos de verrugas genitales. La importancia de realizar junto con la citología una prueba molecular queda manifiesta con la detección del tipo específico asociado a la infección y la posibilidad de desarrollar cáncer.

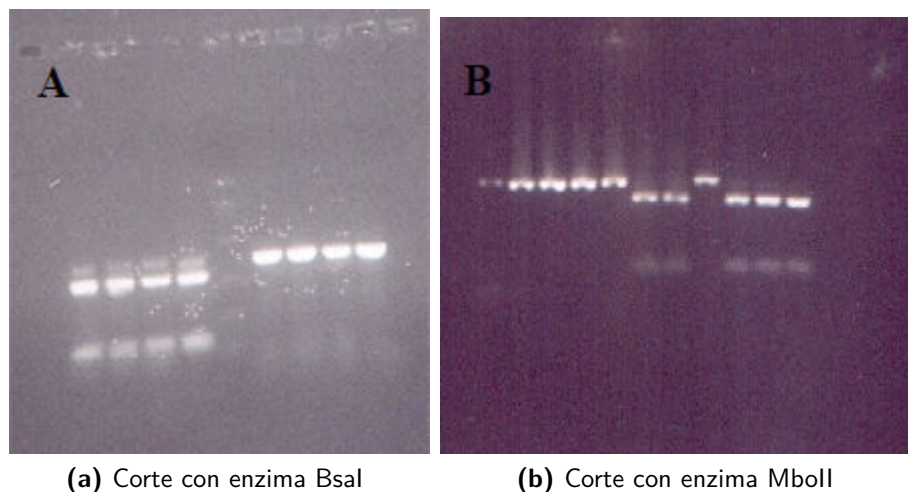


Ejemplo 2: Diagnóstico de cepas resistentes

En este caso se amplifica un fragmento de 425 pb del ADN de *Helicobacter pylori* que codifica para la fracción 23S del ARN r y que corresponde al sitio de unión de claritromicina (macrólido que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas) al ribosoma. Luego se realiza el corte con enzimas

de restricción Bsa I y Mbo I para determinar el tipo de mutación puntual que corresponde al cambio de una Adenina por una Guanina en la posición A 2143 G o A 2142 G respectivamente. Ver Figura 4.2.3

Figura 4.2.3: Identificación de genes de resistencia antimicrobiana.



4.2.4. Técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)

La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE por sus siglas en inglés) fue descrita en 1984 como una herramienta para examinar el ADN cromosómico de organismos eucariotas. Ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas; emerge en los 90s como una técnica de la huella dactilar considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto gram-positivas como los estafilococos, enterococos, y micobacterias y gram-negativas como *E. coli*, otras *Enterobacteriaceae*, y *Pseudomonas*.

En general, la PFGE es una de las técnicas de tipificación más reproducibles y altamente discriminatorias en comparación con otras técnicas moleculares.

En esta técnica, el genoma bacteriano, que típicamente es de 2000 a 5000 kb en tamaño, es digerido con una enzima de restricción que reconoce pocos sitios y genera aproximadamente de 10 a 30 fragmentos de restricción que van de 10 a 800 kb. Todos estos fragmentos pueden ser separados como un patrón de distintas bandas por PFGE, usando una cámara diseñada especialmente que cambia de posiciones en el gel de agarosa entre tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel.

Esta técnica electroforética permite resolver tamaños de ADN del orden de cromosomas. La separación se realiza mediante alternancia del campo eléctrico entre diferentes pares de electrodos provocando una reorientación continua de los fragmentos que migran a través de la agarosa. De esta forma se puede realizar la visualización del ADN de elevado peso molecular. Para prevenir la rotura de las moléculas de ADN, las células intactas se embeben en bloques de agarosa que sirven como soporte para facilitar su colocación en los pocillos de gel. La lisis y desproteinización celular se realiza in situ. Así mismo se puede llevar a cabo la digestión del ADN en el mismo bloque de agarosa. La detección de las bandas se realiza mediante tinción con bromuro de etidio que actúa de forma intercalante.

La PFGE chequea más del 90 % del cromosoma para reordenar fragmentos de gran tamaño que tengan duplicaciones, deleciones, o inserciones de secuencias que van a ser detectadas como un cambio en el tamaño o número del fragmento.

Los patrones de restricción del ADN de los aislamientos en estudio son comparados unos con otros para determinar sus relaciones.

Las principales dificultades asociadas con esta técnica son las relacionadas a las demandas técnicas del procedimiento y costos iniciales del equipo. La preparación de ADN genómico apropiado requiere de 1 a 3 días, dependiendo de los organismos a examinar, siendo los equipos requeridos muy costosos. Sin embargo, el método es operacional en el laboratorio, y puede ser aplicado a un amplio rango de especies con solo un mínimo de modificaciones.

4.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR)

Esta técnica simple y rápida ha sido sucesivamente aplicada para la delineación de cepas genotípicas y análisis de poblaciones genéticas de un amplio rango de patógenos microbianos, incluyendo bacterias, hongos y protozoarios.

El poder discriminatorio es variable de acuerdo al número y secuencia de los primers arbitrarios y a las condiciones de amplificación, sin embargo es buena y puede correlacionarse con otras técnicas de genotipificación. La tipificación con esta técnica, y con métodos similares como el RAPD y el rep-PCR, están basados en la amplificación por PCR de baja astringencia utilizando un primer simple de secuencia arbitraria, típicamente de más de 20 nucleótidos. Después de 2 ciclos de baja astringencia seguido de 1 ciclo de alta astringencia, se obtienen segmentos de ADN amplificado de varios tamaños. Los productos resultantes del PCR pueden representar una variedad de fragmentos de ADN de diferentes tamaños que son visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa.

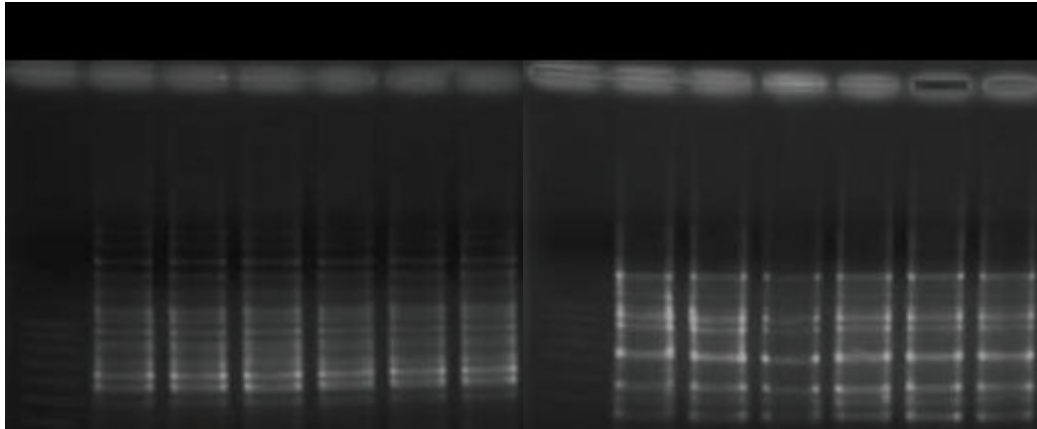
4.2.6. RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN). Ampliación al azar del ADN.

Esta técnica está basada en la amplificación del genoma/ ADN usando primers o iniciadores sencillos de aproximadamente 10 nucleótidos que se pegaran complementariamente sobre una secuencia al azar. Estos primers producen una amplificación al azar de uno o más loci; en ese sentido la técnica de PCR genera una serie de fragmentos de ADN que pueden ser utilizados para comparar poblaciones bacterianas entre sí.

La técnica de RAPD ha sido usada exitosamente en cepas de *E.coli* O157:H7 y ha permitido relacionar y diferenciar cepas aisladas de brotes así como cepas provenientes de animales para demostrar zoonosis. La técnica de RAPD es sensible y eficiente como la PFGE pero tiene la ventaja de ser menos costosa.

La técnica de RAPD es capaz de diferenciar intraserotipos de *E. coli* enterotoxigénico, enteropatógeno y enterohemorrágico. Los análisis realizados muestran fragmentos polimórficos entre 4, 8 y 12 bandas usando estos primers, permitiendo un buen análisis del polimorfismo. En resumen, la técnica de RAPD es una herramienta útil en la epidemiología molecular ya que es capaz de detectar polimorfismos de ADN. El análisis de ADN de cepas que ocasionan casos de zoonosis y brotes epidemiológicos infecciosos puede entonces ser estudiados con la técnica de RAPD por su sencillez y bajo costo.

Figura 4.2.4: Patrón de bandas obtenidos con primers al azar por la técnica de RAPD en cepas de *H. pylori*. Extraído de Toita y col, *Research Article Clonality Analysis of Helicobacter pylori in Patients Isolated from Several Biopsy Specimens and Gastric Juice in a Japanese Urban Population by Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting*, *Gastroenterology Research and Practice*, Volume 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/721306>



4.2.7. Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

El uso de las técnicas microbiológicas tradicionales no es eficiente para evaluar comunidades bacterianas en muestras ambientales ya que la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales esta en el orden de 0,1 % al 10 % de la población total. Por este motivo, los métodos moleculares están reemplazando a los métodos tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas.

La electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (DGGE) es una técnica molecular introducida en la ecología microbiana por Muyzer (1993) y ha sido adaptada como una herramienta para determinar la diversidad microbiana en muestras ambientales. La DGGE es un método electroforético para identificar cambios de una única base en un segmento de ADN. En este tipo de electroforesis, la doble hebra de ADN se somete a una desnaturalización creada mediante un gradiente formado por un agente desnaturalizante y tiene lugar a una temperatura constante. El ADN es extraído de las muestras y amplificado por PCR con primers 16S ADN r bacteriano.

DGGE permite entonces definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de GC.

La utilidad de esta diferenciación radica en que esta situación donde hay mezclas de varios fragmentos de ADN con estas características es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica PCR. Por ejemplo, en ecosistemas abiertos, en mayor o menor grados de diversidad siempre coexisten diferentes tipos de organismos. Si al analizar una muestra de ADN extraído de una muestra ambiental se utilizan iniciadores que aparean en zonas o regiones conservadas de secuencia en una familia génica, se pueden amplificar diferentes secuencias del mismo tipo de gen, pero con gran variabilidad, debido a que provienen de diferentes tipos de organismos. Debido a que todas las especies bacterianas tienen un gen en común muy conservado, el gen ribosomal de la subunidad 16S, y las variaciones en este gen definen grupos taxonómicos en las bacterias, secuencias de este gen han sido utilizadas para analizar la composición de comunidades microbianas en muestras ambientales, o también para determinar rápidamente a que taxón pertenece una cepa o aislamiento bacteriano.

Dado que, adicionalmente, la gran mayoría de especies bacterianas que viven en el ambiente no son cultivables en los medios de cultivos disponibles, los métodos independientes de cultivo, como es la amplificación de genes ribosomales a partir de extractos totales de ADN de suelo, son ampliamente utilizados en estudios de ecología microbiana para determinar la composición de tipos de secuencias, que idealmente corresponden a taxones bacterianos diferentes. DGGE se suele utilizar entonces para discernir la complejidad de secuencia en estas amplificaciones con PCR, pudiendo de esta forma comparar muchas muestras en un mismo gel.

4.3. Identificación genotípica de microorganismos

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados no solo en procesos clínicos asociados a infecciones en el hombre, sino también aquellos que presenten una ventaja desde el punto de vista biotecnológico o ambiental.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable de un proceso infeccioso, conocer las implicancias patogénicas/patológicas, es importante poder determinar el género y la especie en un aislamiento microbiano. Esto permitirá finalmente aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica.

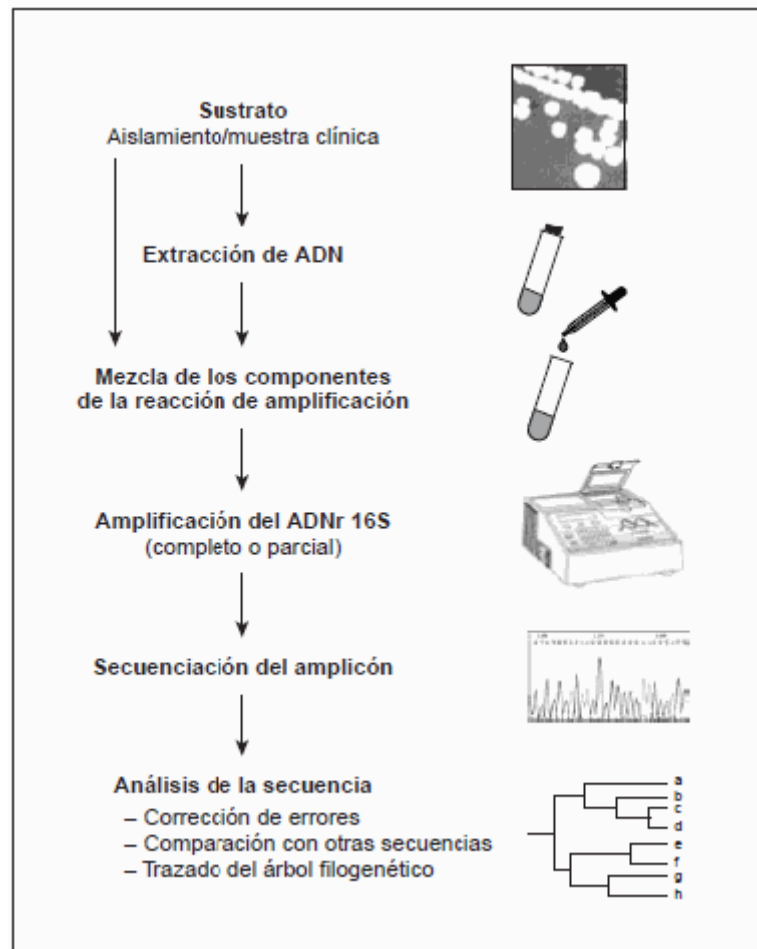
Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos, basados en características fisiológicas o bioquímicas y genotípicos, basados en el estudio del ADN. Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían. Por lo tanto, la identificación fenotípica de los microorganismos presenta problemas porque no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas o una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos. Debido a esto, se han propuesto los métodos moleculares como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de genes estables que permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARN r 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador housekeeping está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARN r 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Por lo tanto, la identificación mediante el ARN r 16S se fundamenta en su secuencia.

Posteriormente, gracias a los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación, se han ido utilizando genes cuya secuencia permite una mayor precisión o una diferenciación intra-especie en grupos.

La caracterización molecular microbiana a partir de una muestra clínica, un alimento, o desde un ambiente natural puede realizarse mediante la detección de genes específicos que permitan su identificación y tipificación. La principal ventaja de estas técnicas es la de no requerir el aislamiento de los microorganismos ni su identificación por microscopía con tinciones especí-

Figura 4.3.1: Procedimiento de identificación genotípica.

Extraído de Rodicio M, Mendoza MC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* (2004) 22:238-45



ficas. Las técnicas moleculares permiten evaluar la biodiversidad de un hábitat amplificando genes específicos.

La taxonomía microbiana mediante técnicas de hibridación y estudios de secuenciación de ácidos nucleicos proveen los mejores y más racionales métodos disponibles para designar especies y determinar la relación entre microorganismos diferentes.

Una especie se puede definir molecularmente cuando incluye cepas con 70 % o más de homología ADN-ADN y 5 °C o menos de diferencia en la temperatura de fusión (melting). La identificación a nivel de especies es el propósito primario de todo esquema de clasificación microbiano, la separación y reconocimiento exacto de subtipos dentro de una especie es importante en todas las ramas de la microbiología, y particularmente en la microbiología médica. Además, en muchos casos, el control de enfermedades no podría ser posible sin el uso de métodos de tipificación para ayudar a definir las fuentes de infección, mecanismos de transmisión y velocidad de diseminación de la infección en una población susceptible. Otras áreas en las cuales la exactitud de la tipificación microbiana es importante incluye estudios ecológicos que involucran el monitoreo de nuevos microorganismos en nuevos hábitats naturales, y programas industriales en la búsqueda de nuevos productos microbianos.

La secuencia completa del ADN constituiría el método de referencia fundamental para reconocer los subtipos dentro de las especies.

Las tinciones fluorescentes se emplean para la enumeración de microorganismos en muestras

clínicas, del ambiente y de alimentos. La tinción con DAPI (4',6-diamido-2-fenilindol) no reacciona con materia inerte y se puede aplicar para muestras de agua y suelo; proporciona una estimación razonable del número de células presentes. Para muestras acuáticas, las células se tiñen en la superficie de un filtro después de haber filtrado un volumen determinado de líquido. Estas técnicas sencillas tienen la ventaja de no ser específicas (tiñen todos los microorganismos de una muestra), pero el inconveniente que presentan es que no diferencian entre células vivas y muertas. La tinción con colorantes fluorescentes que diferencian entre células vivas y muertas como es el caso de Live/Dead BactoLigth Kit) proporcionan información no solo del número de microorganismos de una muestra sino también de la viabilidad de la misma.

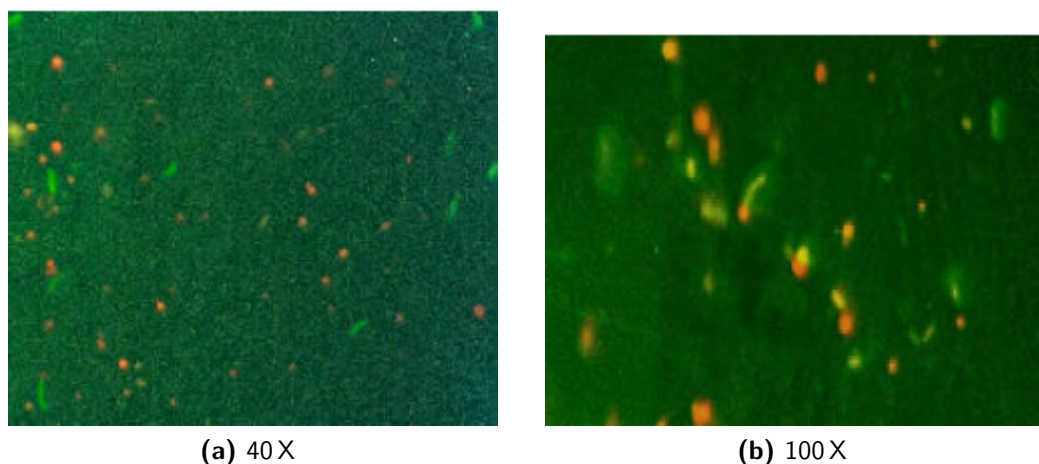
4.3.1. Análisis de poblaciones por microscopía de fluorescencia.

Tomar 1 mL de una suspensión de un crecimiento bacteriano, centrifugar a 9000 g durante 10 min. Lavar el pellet con SF, centrifugar y resuspender en 120-200 μ l (microlitros) de SF según volumen de pellet obtenido. De aquí se toman 80 μ l y se colocan en un Eppendorf cubierto con papel de aluminio y se agrega la mezcla de colorantes fluorescentes: (65 μ l de SYTO 9 que tiñe las células viables de verde, y 35 μ l de Ioduro de Propidio que tiñe las células muertas de color rojo). Se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15-20 min. Se observa en microscopio de fluorescencia. Esta técnica también permite observar los cambios morfológicos observados durante cultivos prolongados, es decir se puede realizar un seguimiento de las características de la población. Entre los cambios morfológicos observados se encuentran las formas cocoides consideradas formas de resistencia en ambientes adversos y con importancia epidemiológica desde el punto de vista de transmisión de enfermedades.

Fundamento del Kit:

El kit Live/Dead BactoLigth brinda información acerca de la viabilidad de las células (actividad metabólica) en un medio determinado. Contiene dos colorantes de ácidos nucleicos: SYTO 9 el cual penetra las membranas libremente y el ioduro de propidio, el cual se encuentra altamente cargado y no penetra normalmente células, salvo que las membranas se encuentren dañadas. Permite observar las células viables de color verde, las muertas de color rojo y las formas de muerte parcial de color naranja o amarillo.

Figura 4.3.2: Identificación genotípica por técnicas de fluorescencia. Observación al microscopio óptico



4.4. Parte práctica

4.4.1. Objetivos

1. Extraer material genético de un cultivo microbiano
2. Amplificar material genético para identificación y caracterización de un microorganismo.
3. Analizar la aplicación de las distintas técnicas moleculares (PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR, rep-PCR, DGGE, FISH) para la caracterización de microorganismos.

4.4.2. Extracción de ADN de una bacteria Gramnegativa

Técnica: Método de “boiling”.

1. Tomar ansada de cultivo de *H. pylori* en placa de agar sangre y suspender en 150 µl de Tritón X-100 al 1 % en buffer TE 1X.
2. Hervir en baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. El efecto conjunto del detergente Tritón y el calentamiento produjeron la lisis bacteriana y la liberación del ADN.
3. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos, y obtener un pellet correspondiente a los restos bacterianos y un sobrenadante con el ADN. Tomar 100 µl del sobrenadante y conservar a 4 °C.

4.4.3. Amplificación de material genético: PCR

Componentes de la Master Mix:

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para síntesis de ADN.
- Dos cebadores o iniciadores (primers), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar. (permiten que la polimerasa inicie la reacción).
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Actúa como cofactor de la polimerasa.
- Una solución tampón o buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa, (Taq) replica hebras de ADN.
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- H₂O ultra pura

Reactivos:

- Buffer: provisto por Promega junto a la Taq ADN polimerasa. Concentración 1X
- Mg^{2+} : concentración de 2.5 mM
- ureA-F: 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
- ureA-R: 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'

- Desoxiribonucleosidos (dNTPs): concentración 0.2 μ M
- Taq ADN polimerasa 1 U
- Agua estéril: puede ser agua destilada o agua de alta calidad.

4.4.4. Corrida electroforética

Buffer (Tris- Acético- EDTA (TAE) 5 X)

- Tris 4,84 g
- Acido Acético glacial 1,142 mL
- EDTA 2,0 mL (0.5 M)
- Agua milliQ 196,85 mL

Gel de agarosa

- Preparar un gel de agarosa al 1,8 % en buffer de corrida TAE (0,5 X).
- Adicionar 1 μ l de GelRed
- Sembrar en cada pocillo, 10- 12 μ l de las muestras amplificadas.
- Someter a una corrida electroforética con voltaje constante (80 volts) durante 45 min.
- Observar en un transiluminador de luz UV el amplificado de 415 pb.

4.4.5. Análisis de la aplicación de técnicas moleculares (PCR-RFLP, RAPD-PCR, rep-PCR, DGGE)

Se realizará mediante la discusión de trabajos de investigación publicados en revistas nacionales e internacionales.

4.5. Bibliografía

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8^a ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. (2000).

Olive D., Bean P. principles and applications of methods for ADN-based typing of microbiol organims. J Clin Microbiol 37:1661-1669. (1999)

Felipe Fernández-Cuenca. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin 22:355-60. (2004)

Forbes BA, Sahm DF, Neissfeld AJ, Trevino A. Diagnóstico Microbiológico Bailey y Scott. Ed. Médica Panamericana.(2004)

5 Determinación cuantitativa del crecimiento microbiano

En microbiología se requieren métodos para medir el número de microorganismos presentes en una determinada muestra. Se mide, el número de células o la masa de las células. Los métodos que miden el número de células son primordialmente importantes para contar el número de organismos unicelulares, como bacterias y levaduras; la medida de la masa celular puede emplearse para todo tipo de microorganismos, inclusive los que forman largos filamentos que no pueden contarse enumerando el número de células. El término "crecimiento", tal como se emplea en bacteriología, se refiere a la magnitud de la población total. Este crecimiento se puede determinar por diversas técnicas:

1. Recuento de células $\left\{ \begin{array}{l} \text{Métodos directos} \\ \text{Métodos indirectos} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{Por microscopía} \\ \text{Por contador electrónico de partículas} \\ \text{Por citometría de flujo} \\ \text{Recuento de colonias} \end{array} \right.$
2. Masa celular $\left\{ \begin{array}{l} \text{Directamente} \\ \text{Indirectamente} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{Peso seco} \\ \text{Determinación cuantitativa de nitrógeno} \\ \text{Turbidimetría} \end{array} \right.$
3. Actividad celular $\left\{ \begin{array}{l} \text{Indirectamente} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{Grado de actividad bioquímica en} \\ \text{relación al tamaño de la población} \end{array} \right.$

El método más común para determinar el número de células es el recuento en placa o recuento de colonias que se basa en el supuesto teórico de que una célula bacteriana da lugar a una colonia, por lo que el número de colonias sobre una placa de agar, corresponderá al número original de microorganismos.

5.1. Recuento o enumeración de células

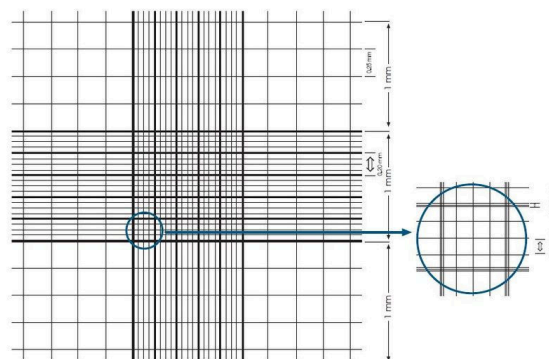
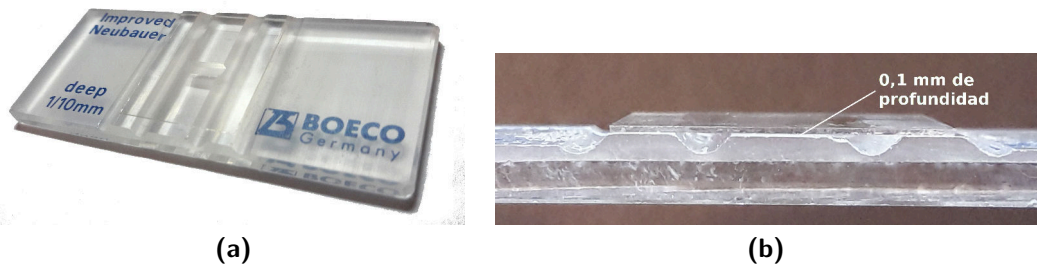
5.1.1. Métodos directos

Microscopía. Enumeración de una suspensión microbiana contenida en una cámara de recuento

Para el recuento de las bacterias se emplean cámaras especiales como las de Petroff-Hauser o la de Neubauer (Figura 5.1.1 a). La cámara de Neubauer tiene una superficie total de 9 mm², dividida en 9 cuadrados de 1 mm² cada uno. Los cuadrados de las cuatro esquinas están divididos a su vez en 16 cuadrados más pequeños. El cuadrado central en 25 cuadraditos, cada uno de los cuales a su vez están divididos en 16 cuadraditos más pequeños (Figura 5.1.1 c). El

espacio entre el portaobjetos reticulado y el cubreobjetos es de 0,1 mm (1/10) (Figura 5.1.1 b), por lo tanto el volumen de la cámara queda perfectamente determinado y es constante, es decir la cámara carga siempre el mismo volumen de muestra.

Figura 5.1.1: Cámara de Neubauer.



(c) Retículo grabado en el lecho de la cámara.
 Reproducido de ©SantiBadia/Wikimedia Commons/CC BY-SA 4.0 & GFDL
 (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg)

Si la población microbiana en estudio fuese muy densa, debe hacerse una dilución previa que luego se debe tener en cuenta en el cálculo final del número de microorganismos. Para realizar el recuento deben contarse todos los microorganismos contenidos en 5 de los 25 cuadraditos centrales y sacar la media. Es necesario contar un mínimo de 100 células para que el recuento obtenido sea exacto.

Cálculo

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = N \times 25 \times 10^4 \times \text{inversa de la dilución}$$

Donde

- N = **valor medio** del recuento de 5 cuadrados.
 25 = número total de cuadrados del mm² central.
 10⁴ = 10³ × 10
 10³ = factor de conversión de mm³ a cm³ ó ml
 10 = factor de conversión de volumen para llevar a 1 mm³

Inversa de la dilución: si por ej. antes de cargar la cámara se realizó una dilución 1/10 de la muestra original, deberá multiplicarse por 10, en cambio en caso de no haber realizado diluciones previas, éste término no deberá incluirse en el cálculo final del número de microorganismos presentes en la muestra en estudio.

Expresión del resultado:

Nº microorganismos /cm³ o Nº microorganismos /ml

Ventajas

- Se requiere poco instrumental
- Los resultados se obtienen rápidamente
- Se pueden observar características morfológicas de los microorganismos que se están enumerando.

Desventajas

- No se distinguen entre células vivas y muertas
- Las células pequeñas no pueden ser contadas
- No es práctica para poblaciones extremadamente numerosas o muy escasas
- No hay gran precisión
- Ocasiona fatiga visual cuando deben realizarse varios recuentos

Recuento utilizando contador electrónico de partículas

Se puede utilizar el contador de Coulter, en el cuál se hace pasar a través de un pequeño orificio y a partir del cambio registrado en la resistencia eléctrica, puede determinarse no sólo el número de partículas, sino también su tamaño. Sin embargo, como este método mide cualquier tipo de partícula que haya en la muestra, sólo es aplicable a suspensiones acuosas de microorganismos y no puede ser usado, por ejemplo para determinar el número de microorganismos en una muestra de suelo.

Citometría de flujo (CMF)

La CMF se inició en la década de los 60 como un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas.

Estudia suspensiones de células vivas o muertas u otras partículas biológicas. Analiza en forma rápida y eficiente, células individuales que fluyen a gran velocidad en un medio líquido y atraviesan una luz monocromática láser. Ver Figura 5.1.2

Cada célula es evaluada según diversas características y parámetros: forma, tamaño, complejidad citoplasmática, composición antigénica y bioquímica.

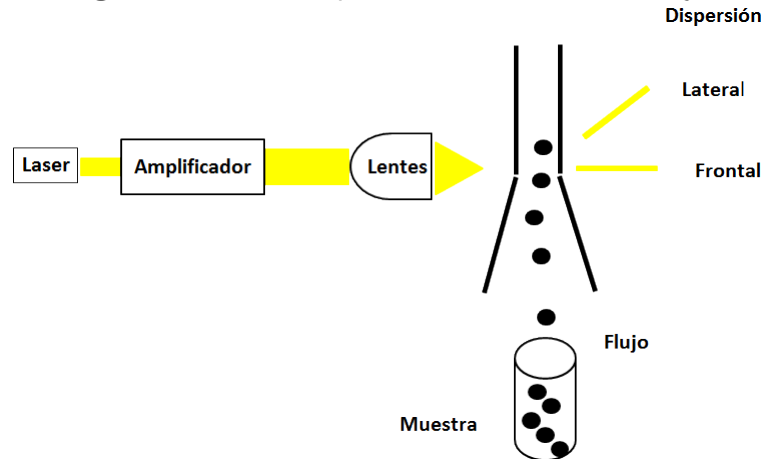
Ventajas

- Permite observar características a nivel de célula individual.
- Técnica rápida: permite medir un gran número de células por segundo
- Alta sensibilidad: Se logran detectar poblaciones con baja frecuencia poblacional.
- Mediciones multiparamétricas: se logran observar entre 5 y 17 parámetros por célula individual.

Sus principales aplicaciones son:

- En hematología: conteo celular, fórmula leucocitaria, conteo reticulocitario, análisis de médula ósea.
- En farmacología: estudios de cinética celular.
- En inmunología: subpoblaciones T, tipaje tisular, estimulación linfocitaria.
- En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorizar tratamiento.
- En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
- En genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

Figura 5.1.2: Principios de la citometría de flujo

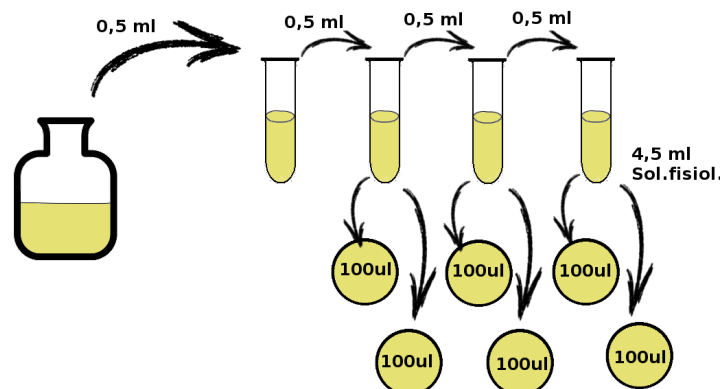


5.1.2. Métodos indirectos

Determinación del número de células por recuento en placa

La técnica consiste en tomar 1 ml de la muestra o un cultivo de bacterias, transferirlo a un frasco con 9 ml de diluyente estéril (solución salina o solución peptonada) y se obtiene la dilución 1 / 10. Se homogeneiza bien y se vuelve a transferir 1 ml a otro frasco con 9 ml de diluyente estéril y se obtiene la dilución 1 / 100, se homogeneiza bien y se transfiere 1 ml a otro frasco con 9 ml de diluyente estéril, obteniéndose la dilución 1 / 1000 (Figura 5.1.3)

Figura 5.1.3: Esquema de trabajo para siembra en placa de Petri.



A partir de cada una de las diluciones y de la muestra original se siembra 1 ml en cajas de Petri que contengan agar nutritivo o el medio adecuado para el desarrollo del microorganismo en estudio (la siembra se hace como mínimo por duplicado).

Debe tenerse la precaución de usar una pipeta estéril distinta para cada frasco de dilución y marcar las placas y frascos con todos los signos de identificación necesarios. Según el esquema de diluciones y transferencias que se muestra más abajo, se puede usar la misma pipeta en las transferencias que están indicadas con la misma letra. La cantidad de diluciones a realizar depende de la magnitud de la población microbiana inicialmente presente en la muestra, para que el número de colonias que desarrollen en la placa de agar sea del orden entre 30 y 300 colonias, para aumentar la exactitud del método y minimizar la interferencia en el crecimiento de un microorganismo a otro.

Las placas deben incubarse invertidas en estufa a 37°C durante 24-48 horas. Una vez que han desarrollado las colonias debe realizarse el recuento. El recuento se realiza con la cámara cuentacolonia (Figura 5.1.4) que consta de un soporte para la placa de Petri, y un sistema de iluminación y una lupa para facilitar la visualización de las colonias. Se cuentan las colonias de toda la placa y se realiza el cálculo:

Figura 5.1.4: Cámara cuentacolonia. *Extraído de Microbes in action 4ª Ed. A Laboratory Manual of Microbiology. Seeley HW, Vandemark PJ, Lee JJ. 1991.*



Cálculo

Nº de colonias en la placa x inversa de la dilución = Nº colonias / ml

Expresión del resultado:

UFC / ml (UFC = unidades formadoras de colonias)

Este método implica asumir que:

- Todo organismo viable origina una colonia.
- La suspensión microbiana es homogénea y no se encuentran presentes agregados.
- Todas las bacterias crecen en el medio y condiciones de incubación.

Ventajas

- Método muy sensible, ya que cualquier organismo viable originará una colonia.
- Identificación del microorganismo, por repique se puede obtener un cultivo puro y su posterior identificación.

- Conteo de distintos tipos de organismos, ya que se pueden formar colonias de diferentes formas, tamaños, colores y texturas.

Desventajas

- No hay seguridad de que una colonia se originó de una sola célula.
- Incapacidad que pueden tener algunos microorganismos para crecer en el medio usado.
- Lento: se debe incubar al menos 24- 48 horas, a veces días o semanas.
- Contar sólo las placas que tienen entre 30 y 300 colonias. Menos de 30 hay un gran error estadístico y más de 300 hay superposición de colonias, por lo tanto error por defecto.

Una **variante** de esta técnica es usar un filtro de membrana. Al pasar una muestra a través de un filtro de membrana que retiene a las bacterias, éstas quedan atrapadas sobre la superficie. Si la membrana se deposita en un medio de cultivo adecuado, las células atrapadas desarrollarán en la superficie del filtro y el número de colonias indicará cuantitativamente la población microbiana. Una vez que los microorganismos han desarrollado, luego de la incubación, se sigue igual que la técnica de recuento en placa. Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, con baja población microbiana, ya que es un método de concentración y el resultado debe referirse siempre al volumen total de muestra filtrada.

5.2. Masa celular

5.2.1. Métodos directos

Cálculo del peso seco

Esta es la técnica más directa para la estimación cuantitativa de una masa de células, y probablemente la más segura y reproducible.

Sin embargo, sólo puede utilizarse para suspensiones muy densas de células, y éstas deben estar bien lavadas para eliminarles toda materia extraña. Esta técnica se aplica principalmente en trabajos de investigación. La técnica consiste en tomar un volumen conocido de la suspensión celular (5- 10 ml) y depositarlo en tubos de centrifuga. La muestra se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm para separar las células y luego el sedimento de células se lava dos veces con agua destilada. La biomasa se trasvasa cuantitativamente a un pesafiltro previamente tarado con ayuda de agua destilada y se lleva a estufa a 105 °C hasta pesada constante (cuando tres pesadas sucesivas indique el mismo valor).

Cálculo

$$Ag\ de\ biomasa = P - T$$

Donde

P = Peso final de la cápsula

T = Tara de la cápsula

$$\begin{aligned} Ag\ de\ biomasa &\longrightarrow 5\ ml\ muestra \\ X &\longrightarrow 1000\ ml\ de\ muestra \end{aligned}$$

Expresión del resultado:

gramos de biomasa / litro de caldo

Actualmente existen aparatos que realizan la determinación de peso seco en forma automática, utilizando como fuente de calor una lámpara de luz infrarroja. Se selecciona el tiempo del proceso, la temperatura o intensidad de calor. Una vez terminado el proceso, el aparato se apaga automáticamente y en un visor aparece directamente el porcentaje de peso seco y apretando una tecla este valor puede aparecer expresado en gramos.

Este aparato opera entre 35 y 160°C, y por cada punto o nivel de calentamiento aumenta 6,25°C y facilita en gran medida la tarea del operador, reduciéndose el tiempo que se tarda para realizar la operación de determinación de peso seco. Además, permite seleccionar la humedad residual de la muestra. Este equipo no sólo es útil para determinaciones de peso seco, sino también cuando se desean realizar técnicas de calentamiento programados.

Determinación cuantitativa de nitrógeno

Entre los principales constituyentes del material celular se encuentran las proteínas, y como el nitrógeno es un componente fundamental de éstas, puede estimarse la población de células en función del nitrógeno bacteriano.

El contenido medio de nitrógeno en las bacterias es el 12 % en peso seco, aunque esta cifra está sujeta a variaciones por las condiciones del cultivo y por las distintas especies.

Para medir el crecimiento con esta técnica, se debe recoger en primer lugar las células, lavarlas para privarlas del medio y de toda sustancia extraña que pueda aportar nitrógeno y realizar con ellas un análisis químico cuantitativo de nitrógeno. Las determinaciones de nitrógeno bacteriano son laboriosas y se deben efectuar sobre muestras libres de otros compuestos nitrogenados extraños.

Técnica

Se toma un volumen conocido de muestra, se centrifuga, se desecha sobrenadante, se resuspende en igual volumen de agua destilada para lavar las células, esta operación se realiza dos veces, luego a las células lavadas se les determina nitrógeno por la técnica de Kjeldhal (A g de nitrógeno)

Cálculo

Si el nitrógeno constituye el 12 % del peso seco de las bacterias:

$$\begin{array}{l} 12 \text{ g Nitrógeno} \longrightarrow 100 \text{ g de biomasa (peso seco)} \\ A \text{ g} \longrightarrow X \text{ g de biomasa} \end{array}$$

Conociendo el volumen de la muestra a la que se realizó la determinación de nitrógeno, puedo expresar el resultado referido a un volumen determinado. Por ej., si se partió de 10 ml de muestra:

$$\begin{aligned} 10 \text{ ml de muestra} &\longrightarrow X \text{ g de biomasa} \\ 1000 \text{ ml de muestra} &\longrightarrow b \text{ g de biomasa} \end{aligned}$$

Expresión del resultado

gramos de biomasa / litro

5.2.2. Métodos indirectos

Turbidimetría

Los métodos turbidimétricos son utilizados frecuentemente para medir masa de células. Estos se basan en el hecho que una población de células en un medio líquido bloquea o dispersa la luz en proporción a su masa total en un cultivo.

Bajo condiciones estandarizadas, las cantidades de estos compuestos proporcionan una determinación razonablemente precisa del protoplasma existente en el cultivo.

Un cultivo bacteriano actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él. Dentro de ciertos límites, la luz absorbida o reflejada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración de las células que hay en el cultivo. Por lo tanto, se puede estimar el número de células presentes en una suspensión bacteriana al aplicar **Nefelometría**, es decir la medida de la reflexión de los rayos de luz, o bien **Turbidimetría**, es decir la medida del porcentaje de absorción de la luz.

Para estas determinaciones se utiliza un fotocolorímetro o un espectrofotómetro. Este instrumento posee una fuente de luz monocromática (es decir de una sola longitud de onda) generalmente depende de un filtro que permite que sea transmitida únicamente la longitud de onda deseada. Esta luz pasa a través de un cultivo microbiano y la cantidad de luz transmitida o reflejada se mide mediante una célula fotoeléctrica conectada a un galvanómetro.

La mayor parte de las estimaciones del crecimiento microbiano se hace empleando fotocolorímetros como turbidímetros, y sólo en raras ocasiones se utilizan como nefelómetros.

En la turbidimetría, la capacidad de un cultivo para detener la luz puede expresarse como porcentaje de luz transmitida. Dentro de ciertos límites, este porcentaje es inversamente proporcional a la concentración de células.

Generalmente, resulta más útil expresar la turbidez como densidad óptica (DO), la cuál es directamente proporcional a la concentración de células.

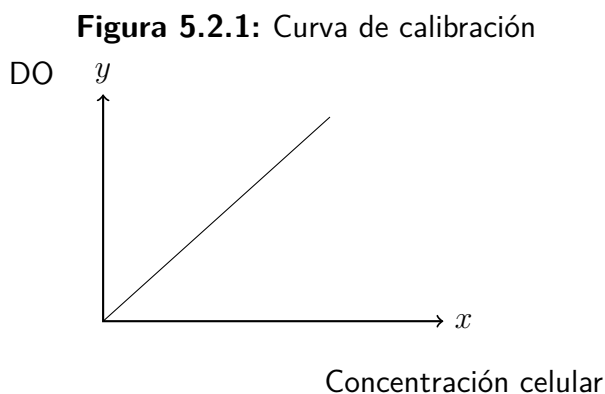
En el uso de la turbidimetría para medir el número total de bacterias, se correlaciona por ej. con el recuento cuantitativo en placa, así se mide la turbidez de varias diluciones de un cultivo bacteriano y se hacen también recuentos en placa, entonces a partir de los resultados, se buscará correlación entre turbidez y el número de células y así se puede construir una tabla trabajando en condiciones previamente estandarizadas.

Condiciones operativas

Cuando trabajamos con medios de cultivo coloreados, que absorben a la longitud de onda de trabajo debemos, en primer lugar, realizar la calibración del aparato.

Cálculo

Con los valores de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro, como datos de DO, para la muestra vamos a una curva de calibración construida según se especifica más arriba, y así se obtiene el número de células contenidas en una muestra. (Figura 5.2.1)



Ventajas

- Facilidad de ejecución
- Suministra resultados inmediatos

Desventajas

- No pueden utilizarse para materiales intensamente coloreados o que lleven en suspensión materiales en distintos a los microorganismos.
- No es aplicable a suspensiones no homogéneas (organismos filamentosos)

5.3. Actividad celular

5.3.1. Determinación de la masa celular por valoración química de la actividad celular

Es posible determinar indirectamente la masa celular estimando la actividad metabólica de la célula.

1. Consumo de oxígeno: organismos aeróbicos, velocidad de consumo semejante a la masa celular.
2. Liberación de anhídrido carbónico: para organismos anaerobios.
3. Liberación de productos de fermentación: ácidos a partir de hidratos de carbono, ác. láctico, etc.

En estos casos es importante hacer previamente la curva de calibración. Por ser éste un método indirecto sólo son aplicables en circunstancias especiales.

Técnica

Si una bacteria produce ácido, por ejemplo, por fermentación de un determinado hidrato de carbono, podemos determinar la masa celular en función de la cantidad de ácido producida.

A partir de una muestra contenida en un medio de cultivo adecuado, conteniendo una cantidad conocida de hidratos de carbono, se produce una cantidad de ácido que se puede valorar por una titulación ácido- base o mediante una reacción colorimétrica. A mayor cantidad de ácido, mayor población microbiana.

5.4. Parte práctica

5.4.1. Objetivos

1. Enumerar las células de un cultivo de levadura en cámara de Neubauer.
2. Realizar el recuento de colonias de un producto alimenticio (yogur)
3. Determinar masa celular mediante peso seco de cultivos microbianos (cianobacteria-levadura)

5.4.2. Enumeración de células en cámara de Neubauer (método directo)

Se realizarán diluciones de una suspensión de levaduras para su recuento en cámara de Neubauer según sec. 5.1.1

5.4.3. Recuento en placa (método indirecto)

Se realizarán diluciones de un producto alimenticio (yogurt) que posee una carga de lactobacilos conocida, para corroborarlo por recuento de UFC/ml en placa de Petri con medio de cultivo MRS. Se seguirá el protocolo descrito en sec. 5.1.2, pero en este caso realizar diluciones de 0,5 ml de muestra en 4,5 ml de diluyente.

Se colocará 0,1 ml de dilución sobre la superficie del medio MRS y se extenderá con espátula de Drigalsky hasta su completa absorción.

5.4.4. Cálculo de la masa celular, técnica de peso seco (método directo)

Se realizará según sec. 5.2.1.

5.5. Bibliografía

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. (2000)

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN y Ginsberg, HS. Tratado de Microbiología. ED. Salvat. 4 Ed. (1997).

6 Cinética del crecimiento microbiano

6.1. Sistemas de cultivos microbianos

6.1.1. Cultivo discontinuo (Batch Culture)

El cultivo en batch es uno de los diversos sistemas de desarrollo de un microorganismo, en el cual un volumen dado de medio nutriente es inoculado con una determinada cantidad inicial de microorganismo. Al no entrar ni salir nutrientes, este puede ser considerado un sistema “cerrado”.

La inoculación del fermentador es seguida por una serie de fases en el cultivo:

1. **fase lag o período de retardo**, donde prácticamente no hay división celular pero sí aumento de masa individual
2. **fase de crecimiento exponencial**, donde el crecimiento ocurre a la máxima velocidad y este período dura hasta que se consume totalmente uno de los nutrientes esenciales o aparece un producto inhibidor. Al final de la misma se alcanza el máximo valor de biomasa
3. **fase estacionaria**, donde la concentración de microorganismo permanece constante
4. **fase de declinación o muerte**, última etapa donde la concentración decrecerá como resultado de la autólisis o como consecuencia del metabolismo de mantenimiento.

La duración de cada una de estas fases es función del microorganismo en estudio y de la composición del medio de cultivo empleado.

La representación gráfica de estas fases (concentración de microorganismos vs. tiempo) nos da una curva típica de las reacciones autocatalíticas, es decir, aquellas en la que el producto formado cataliza la reacción, incrementándose la velocidad con el tiempo. Las reacciones autocatalíticas en general, son consideradas de segundo orden, sin embargo, en los procesos fermentativos al considerarse que todos los reactivos (nutrientes) están en exceso y en consecuencia permanecen constantes durante la reacción, se transforma en una cinética de primer orden. El tratamiento matemático, debido a estas consideraciones, es solo aplicable a la etapa de crecimiento exponencial, quedando excluidas de este modelo sencillo las demás fases ya nombradas.

La velocidad de crecimiento se expresa:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (6.1.1)$$

En donde

$\frac{dx}{dt}$ = velocidad de crecimiento del microorganismo

x = concentración de microorganismo dt

$$\mu = \frac{dx}{x \cdot dt} = \text{velocidad específica de crecimiento}$$

Si consideramos a μ constante (esto ocurre cuando hay exceso de sustrato) podemos integrar esta ecuación y nos queda:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu \cdot t \quad (6.1.2)$$

en consecuencia

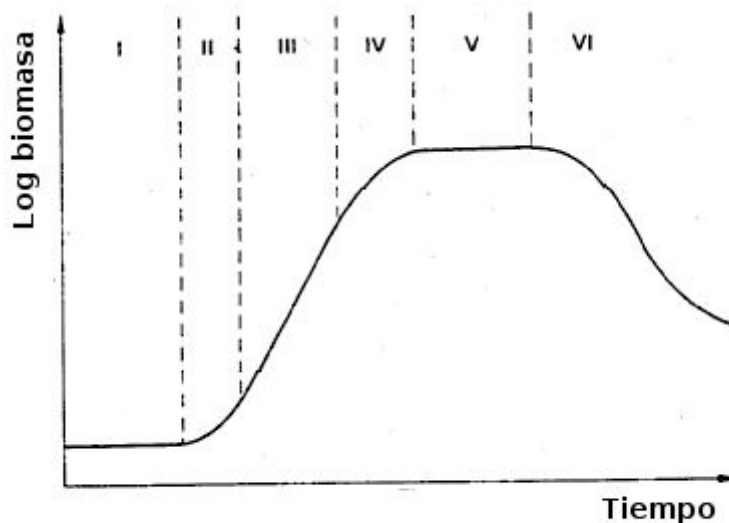
$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (6.1.3)$$

donde x_0 = concentración inicial de microorganismos.

Graficando \ln vs. t (Figura 6.1.1), de la pendiente de la recta calculamos μ .

Figura 6.1.1: Curva de crecimiento en sistema batch.

I: lag, II crecimiento acelerado, III crecimiento exponencial, IV: crecimiento desacelerado, V: fase estacionaria, VI: declinación



En la gráfica se observan dos fases o períodos transicionales de crecimiento (II y IV) debido a que un cultivo procede gradualmente de una fase a otra. Esto implica que no todas las células están exactamente en idénticas condiciones fisiológicas hacia el final de una determinada fase, por ejemplo al final de la lag y comienzo de la exponencial (log).

La ecuación 6.1.3 nos muestra que la concentración del microorganismo aumentará exponencialmente con el tiempo. A partir de la ecuación 6.1.2 podemos calcular el tiempo de generación del microorganismo (periodo de tiempo en que la biomasa se duplica) haciendo $x = 2x_0$, y nos queda:

$$t = tg = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (6.1.4)$$

Monod encontró que existe una relación sencilla entre μ y la concentración de sustrato esencial para el crecimiento. Esta es idéntica a la relación existente entre la velocidad de reacción de una enzima y su sustrato establecida por Michaelis y Menten. Por tanto:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (6.1.5)$$

Donde

S = concentración de sustrato

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad específica de crecimiento máxima (valor que se obtiene a concentraciones de sustrato saturante $S \gg K_s$)

K_s = constante de saturación que es numéricamente igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = \frac{1}{2} \mu_{m\acute{a}x}$.

De acuerdo a las consideraciones hechas al introducir el tratamiento al cultivo en sistema discontinuo, vimos que una de ellas es que los reactivos (sustratos) estén en exceso. En consecuencia al trazar la curva \ln vs. t con los datos obtenidos en la experiencia podemos calcular el $\mu_{m\acute{a}x}$ para ese medio de cultivo.

Existe también una relación simple que nos da la velocidad de consumo de sustrato por un microorganismo y que se expresa como q_s (velocidad específica de consumo de sustrato).

$$q_s = \frac{ds}{x \cdot dt} \quad (6.1.6)$$

Otra relación nos vincula crecimiento y utilización de sustrato:

$$\frac{dx}{dt} = -Y \frac{ds}{dt} \quad (6.1.7)$$

Donde

Y = constante de rendimiento

De la ecuación 6.1.7 podemos escribir:

$$Y = \frac{dx}{dt} / \frac{ds}{dt} = \frac{\mu}{q_s} \quad (6.1.8)$$

Si consideramos a Y constante durante todo el proceso la ecuación 6.1.8 nos queda:

$$Y = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (6.1.9)$$

Por tanto esta constante nos da el peso de microorganismos formados por unidad de peso de sustrato utilizado. Es un parámetro importante, ya que nos indica los requerimientos cuantitativos de nutrientes del microorganismo en estudio.

Otra constante que se puede calcular a partir de los datos obtenidos en un proceso en sistema discontinuo es la productividad (P) del mismo, que nos expresa la masa celular formada por unidad de tiempo y por unidad de volumen. Entonces existe una P para cada tiempo de proceso que se expresa.

$$P = \frac{X(t)}{t} \quad (6.1.10)$$

Donde

$X(t)$ = concentración celular al tiempo t

En consecuencia se puede ver a través de la curva de crecimiento que la máxima concentración celular no coincide en general con la máxima productividad.

6.1.2. Cultivo discontinuo alimentado (Fed - batch Culture)

Un caso intermedio entre el cultivo discontinuo (batch) y el cultivo continuo es el cultivo discontinuo alimentado. Esta modalidad de realizar una fermentación consta de 2 etapas. En la primera de ellas (similar al batch) los microorganismos crecen en un volumen determinado hasta una cierta concentración celular, donde comienza la segunda etapa con la alimentación de medio fresco a un determinado flujo similar a un cultivo continuo, por lo tanto el volumen aumenta durante el proceso, hecho que lo distingue de los sistemas anteriores. Por lo expuesto es evidente que el volumen de caldo cosechado será la suma del volumen inicial mas el adicionado durante la etapa de alimentación.

6.1.3. Cultivo continuo

El proceso en sistema continuo comienza en la misma forma que el sistema discontinuo, pero en un determinado momento del crecimiento celular se comienza a introducir medio fresco al sistema y a descargar el contenido del mismo a igual caudal, de manera que el volumen del cultivo permanece constante. Este es por tanto un sistema abierto.

6.2. Crecimiento de levaduras

Las levaduras pueden ser categorizadas en varios grupos de acuerdo a sus modos de producción energética, utilizando respiración o fermentación. Cabe señalar que estos procesos son principalmente regulados por factores ambientales, donde la disponibilidad de glucosa y oxígeno son muy influyentes en el crecimiento celular. Así, las levaduras pueden adaptarse a distintas variaciones ambientales, y aún dentro de una misma especie, las vías metabólicas dependerán de las condiciones de cultivo.

S. cerevisiae es un microorganismo con múltiples aplicaciones biotecnológicas (productor de etanol, de biomasa, de proteínas recombinantes y de antibióticos). Además, es un organismo modelo por su alta homología con otras células eucariotas. Por razones históricas, el metabolismo de glucosa de *S. cerevisiae* es el proceso metabólico mejor comprendido debido a su rol central en las industrias de fermentación tradicional.

Tabla 6.1: Principales modos de respiración en levaduras.

Tipos	Ejemplos	Respiración	Fermentación	Crecimiento anaeróbico
Respiración aeróbica obligada	<i>Rhodotorula</i> , <i>Cryptococcus</i>	Si	No	No
Respiración aeróbica	<i>Candida</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i>	Si	anaeróbico ¹	No
Fermentadores aeróbicos	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	limitado	aeróbico y anaeróbico	No
Fermentadores aeróbicos facultativos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	limitado	aeróbico y anaeróbico	facultativo, pero no crece en ausencia de esteroides y ácidos grasos
Fermentadores obligados	<i>Torulopsis</i>	No	anaeróbico	Si

El metabolismo de glucosa por *S. cerevisiae* puede ser aeróbico o anaeróbico dependiendo de las condiciones de cultivo, la disponibilidad de sustrato limitante y el continuo suministro de suplementos minerales, nitrógeno y factores de crecimiento. Esta levadura es capaz de realizar respiración y fermentación simultánea a velocidades de crecimiento elevadas en condiciones aeróbicas, denominándose a este metabolismo "efecto Crabtree"; el cual tiene importantes consecuencias en los procesos industriales destinados a la producción de biomasa de levadura, donde la formación de subproductos fermentativos es un aspecto no deseado. A pesar de los numerosos estudios existentes no existe una clara e unívoca explicación de este fenómeno; algunos autores explican este fenómeno a través de una represión catabólica por glucosa, mientras que otros la atribuyen a una saturación de piruvato y NADH que sobrepasa la capacidad respiratoria de la mitocondria.

La producción de levadura de panificación se realiza en condiciones aeróbicas, eliminando o minimizando la producción de etanol. En la práctica, es normalmente alcanzada mediante sistemas operados en modo de alimentación intermitente ("fed-batch") que permite el control de la concentración de glucosa dentro del rango de 0,1 - 0,25 g/l. A velocidades de crecimiento de $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$, el metabolismo de *S. cerevisiae* es puramente oxidativo, indicando la ausencia de productos de fermentación y altos rendimientos en biomasa. A valores de μ más elevados el efecto Crabtree es inducido, el cual se manifiesta por una formación incrementada de etanol, acetato y glicerol. La contribución relativa de la fermentación a la actividad metabólica general aumenta con el incremento en la velocidad de crecimiento. A valores de $\mu = 0,30 \text{ h}^{-1}$ cerca del 25 % de la glucosa utilizada es direccionada hacia la vía fermentativa, indicando que aún es principal el metabolismo respiratorio. Si la velocidades se incrementan a valores de $\mu = 0,40 \text{ h}^{-1}$, más del 50 % de la glucosa es canalizada a través de la vía fermentativa.

En un cultivo discontinuo, luego del consumo de moléculas de carbohidratos, usualmente de 6 átomos de carbono (C6) como glucosa a componentes de dos átomos de carbono (C2) en particular etanol, cambia el metabolismo de *S. cerevisiae*. El etanol se transforma en sustrato y es degradado en presencia de O₂. Este cambio metabólico es conocido como cambio diaúxico. En algunas circunstancias, esta capacidad del etanol es empleada en la producción de levaduras

de panificación para mejorar la eficiencia y economía del proceso productivo. Etanol presenta rendimientos más altos que los azúcares de 6C debido a su mayor grado de reducción y contribuye a disminuir la carga del efluente de la planta industrial.

Durante la fermentación (aeróbica o anaeróbica) *S. cerevisiae* recicla el NADH en la conversión acetaldehído a etanol. Esta conversión es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh), la cual puede en principio, catalizar la reacción en ambas direcciones, aunque con diferentes eficiencias catalíticas. La Adh citoplasmática en *S. cerevisiae* es codificada por dos genes: *adh1* es expresado constitutivamente mientras que *adh2* es expresado solo cuando la concentración de azúcar se agota. La Adh1 tiene una elevada K_s para etanol, lo cual es consistente como producto de reacción. En cambio, Adh2 tiene un K_s 10 veces menor.

6.3. Parte práctica

6.3.1. Objetivos

1. Estudiar las cinéticas de crecimiento de levaduras Crabtree positivas y negativas en cultivos discontinuos bajo condiciones controladas de temperatura y agitación.
2. Evaluar diversos aspectos de crecimiento, tales como: biomasa final alcanzada, rendimiento celular, velocidad específica de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto (etanol).

6.3.2. Condiciones de cultivo

1. Se preparan tubos en pico de flauta con medio YPD agarizado y se siembran con las dos levaduras. Se incuban a 25-30 °C durante 24 horas.
2. Se preparan 500 ml del medio YPD y se colocan 75 ml en 2 erlenmeyers provistos de deflectores, los cuales son esterilizados a 121 °C durante 15 minutos.
3. Se inoculan ambos erlenmeyers con una suspensión de levaduras en medio YPD y se incuban a 30 °C en agitación (200 rpm)
4. Crecimiento celular: se toman muestras cada 2 horas y se determina la biomasa mediante medidas de densidad óptica a 580 nm y recuento por microscopía. Se determina biomasa inicial y final con la técnica de peso seco.
5. Determinaciones analíticas: concentración de glucosa por el método enzimático y concentración de etanol mediante el método de microdifusión.

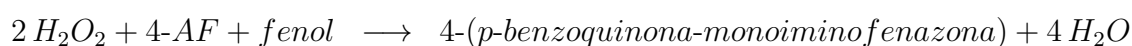
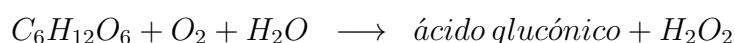
Medio de cultivo YPD

Extracto de levadura	10 g
Peptona	10 g
Glucosa	30 g
Agua destilada	1000 ml
El pH se controla a 5,3.	
Para preparar medio sólido se agrega 1,5 g % de agar.	

6.3.3. Determinación de glucosa

Fundamento

La glucosa formada se determina por el ensayo enzimático con glucosa oxidasa (GOD).



La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y agua oxigenada; el H₂O₂ en presencia de peroxidasa (POD) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar a la formación de un cromógeno rojo-cereza con absorbancia máxima a 505 nm.

Método

En tres tubos marcados B (blanco), S (standard) y M (muestra) o D (desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard		30 µl	
Muestra			30 µl
Reactivo de Trabajo	3 ml	3 ml	3 ml

Incubar 10 minutos en baño de agua a 37 °C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm. Llevando a cero con el blanco.

Reactivos: Kit de Glicemia de Wiener

Cálculos

La concentración de glucosa se determina en g/l usando la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa (g/l)} = \frac{D}{S}$$

Donde

D: absorbancia de la muestra o desconocido

S: absorbancia del standard.

6.3.4. Determinación de etanol por el método de microdifusión

Fundamento

El etanol es liberado de material biológico por una solución saturada de carbonato de potasio, difunde a la cámara central y allí es oxidado por una solución sulfúrica de dicromato de potasio.

Esta técnica se hace cuantitativa trabajando con un blanco de solución de dicromato de potasio y testigo de concentración conocida. Finalmente se hace determinación espectrofotométrica y puede utilizarse para la determinación de etanol en sangre, orina, suero o tejido homogeneizado.

Reactivos

- Solución saturada de carbonato de potasio.
- Solución sulfúrica de dicromato de potasio, disolver 3,70 g de dicromato de potasio en 150 ml de agua destilada. Cuidadosamente agregar 280 ml de ácido sulfúrico concentrado y diluir a 650 ml.

Técnica

Preparar una celda de Conway para la muestra 1, una celda de Conway para el testigo y además se trabaja con un blanco 3.

1. **Cámara central:** 2 ml de solución sulfúrica de dicromato de potasio.
Cámara externa: 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio + 0,8 ml de muestra.
Tiempo de difusión: 3 h a temperatura ambiente.
2. **Cámara central:** 2 ml de solución sulfúrica de dicromato de potasio.
Cámara externa: 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio + 0,8 ml de testigo.
Tiempo de difusión: 3 h a temperatura ambiente.
3. Preparar un blanco con 2 ml de solución sulfúrica de dicromato de potasio en tubo graduado y llevar a 10 ml con agua destilada.

Determinación cuantitativa

Transferir desde cámara central de las celadas 1 y 2 las soluciones en forma cuantitativa (lavando la cámara con agua destilada y recogiendo) a probeta graduada de 10 ml y llevar a volumen con agua destilada. Determinar las absorbancias de 1 (A muestra), 2 (A testigo) y 3 (A blanco) a 500 nm.

Cálculos

$$Etanol(g/l) = F \cdot (A_{blanco} - A_{muestra})$$

$$F = \frac{testigo(g/l)}{(A_{blanco} - A_{testigo})}$$

Reacciones



6.3.5. Realización de gráficas y cálculo de parámetros

1. Representar el crecimiento celular de ambas levaduras mediante la utilización de una planilla de cálculo, indicando el consumo de la fuente de carbono y la producción del metabolito primario.
2. Calcular todos los parámetros cinéticos a partir de la gráfica.
3. Interpretar la producción de biomasa y de etanol en ambas levaduras en las condiciones de cultivo establecidas.

6.4. Bibliografía

Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall 8ª ed, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 986p. (2000)

Jure Piškur, Elzbieta Rozpedowska, Silvia Polakova, Annamaria Merico and Concetta Compagno. Trends in Genetic. "How did Saccharomyces evolve to become a good brewer?" Vol.22 N°4 (2006)

Trevan, M.D., Boffey, S., Goulding, K.H. y Stanbury, P. Ed. Acribia SA. "Biotecnología: Principios biológicos" (1990)

Frick, O. and Wittmann, C. "Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in Saccharomyces cerevisiae by comparative 13C flux análisis" Microbial Cell Factories, 4:30 (2005)

7 Enfermedades infecciosas

7.1. Parte práctica

7.1.1. Objetivo

Realizar seminarios sobre casos clínicos de distintas enfermedades infecciosas.

7.1.2. Modalidad del seminario

Los seminarios se prepararán a partir de casos clínicos infectológicos que serán oportunamente proporcionados por los docentes. Se expondrán individualmente o en grupos, debiendo emplear soporte multimedia (Power Point, Prezi, PDF). En las diapositivas se deberá reflejar el trabajo de comprensión y síntesis de la lectura realizada. La exposición deberá realizarse en un tiempo aproximado de 10 minutos.

7.1.3. Evaluación

Se evaluarán en forma oral los conceptos expuestos y además se deberá entregar a la cátedra el archivo multimedia en forma digital o impresa.

7.2. Bibliografía

Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica Mc Graw Hill Editores. 25a. edición. 2010

Jawetz, Melnick y Adelberg. Medical mycrobiology Mc Graw Hill Editions. 27th ed. 2016

8 Evaluación de la actividad antibacteriana de desinfectantes

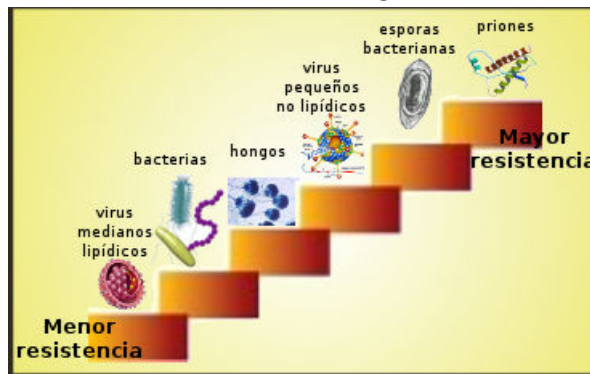
8.1. Factores que afectan el proceso de desinfección.

8.1.1. Factores microbiológicos

Resistencia innata de los microorganismos

Existe una amplia variación en la sensibilidad de los microorganismos a los desinfectantes en general como se observa en la Figura 8.1.1.

Figura 8.1.1: Resistencia de los microorganismos a los desinfectantes.



Las causas moleculares de la resistencia innata de los microorganismos a los desinfectantes no están totalmente dilucidadas, sin embargo se sabe que el principal mecanismo involucrado es la impermeabilidad celular. Como ejemplo de esto podemos citar la membrana externa de las bacterias gram negativas, que impide la entrada de triclosán y compuestos de amonios cuaternarios; o las envolturas y corteza de las esporas que impiden el ingreso de estos últimos, fenoles y clorhexidina. En este mismo sentido, se entiende la mayor resistencia a los desinfectantes que manifiesta el desarrollo microbiano en biopelículas o intracelular en relación al crecimiento planctónico. Esto es importante a la hora de evaluar la actividad de un desinfectante mediante pruebas de desafío, ya que deberemos probar un amplio rango de microorganismos con distinta sensibilidad.

Los desinfectantes se pueden clasificar en función del nivel de acción frente a los distintos tipos de microorganismos (ver Tabla 8.1).

Densidad microbiana

Está demostrado que bajo las mismas condiciones de evaluación, una mayor densidad microbiana requiere mayor tiempo para que el desinfectante ejerza su acción. Esto se debe a que la

Tabla 8.1: Clasificación de desinfectantes en función del nivel de acción.

NIVEL	ACTIVO FRENTE A:	COMPUESTOS
Alto	Esporas bacterianas, micobacterias, virus no lipídicos, hongos y levaduras, formas vegetativas, virus lipídicos	Glutaraldehído 2 %, formol 20 %, peróxido de hidrógeno, cloro (> 5000 ppm)
Medio	Micobacterias, virus no lipídicos, hongos y levaduras, formas vegetativas, virus lipídicos	Alcoholes, cloro (< 5000 ppm), yodóforos, clorhexidina, fenólicos
Bajo	Hongos y levaduras, formas vegetativas, virus lipídicos	Amonios cuaternarios, anfóteros, mercuriales

mayoría de los desinfectantes necesitan una etapa previa de adsorción a la superficie celular antes de poder actuar.

Como consecuencia, la reducción de 3 log partiendo de una carga de 10^8 o 10^4 células no requiere la misma cantidad de tiempo para ambos casos. La carga microbiana inicial debe estar perfectamente estandarizada en toda prueba de desafío de desinfectantes.

8.1.2. Factores físico-químicos

Concentración del desinfectante

Con excepción de los iodóforos, a mayor concentración del agente desinfectante, mayor es su eficacia, siendo la relación entre concentración y potencia de tipo exponencial. Cuando se grafica el log de tiempo de muerte vs concentración del desinfectante, se obtiene una recta cuya pendiente recibe el nombre de Coeficiente de Dilución (η) según la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{\log(T2) - \log(T1)}{\log(C1 - C2)}$$

Donde C1 y C2 son dos concentraciones distintas de desinfectantes, T1 y T2 los tiempos requeridos para destruir una carga microbiana estándar a las correspondientes concentraciones.

A mayor valor de η , el efecto de la dilución es mayor (Tabla 8.2).

Temperatura

Temperatura y velocidad de desinfección son siempre directamente proporcionales, y están relacionadas por el coeficiente Q_{10} según la siguiente fórmula.

$$Q_{10} = \frac{\text{Tiempo de muerte a } T^0}{\text{Tiempo de muerte a } (T^0 + 10^\circ\text{C})}$$

Tabla 8.2: Valores de η para distintos desinfectantes

Desinfectante	η
Peróxido de hidrógeno	0,5
Nitrato de plata	0,9-1,0
Compuestos mercúricos	0,03-3,0
Ioduro	0,9
Cristal violeta	0,9
Clorhexidina	2
Formaldehído	1
Compuestos de amonio cuaternario	0,8-2,5
Acridinas	0,7-1,9
Agentes liberadores de formaldehído	0,8-0,9
Bronopol	0,7
Biguanidas poliméricas	1,5-1,6
Parabenos	2,5
Acido sórbico	2,6-3,2
Laurato de potasio	2,3
Alcoholes benzílicos	2,6-4,6
Alcoholes alifáticos	6,0-12,7
Eteres glicolmonofenólicos	5,8-6,4
Eteres glicolmonoalquílicos	6,4-15,9
Agentes fenólicos	4,0-9,9

Donde T^0 y $(T^0+10^\circ\text{C})$ son temperaturas que difieren exactamente en 10°C . La estandarización de la temperatura en las pruebas de desafío de desinfectantes es de fundamental importancia.

Presencia de posibles interferentes

El pH del medio interviene en el grado de disociación de la molécula de desinfectante. Si la forma activa del agente es la molécula neutra o ionizada, su actividad se verá afectada de acuerdo a los distintos valores de pH. Por ello, se debe considerar la naturaleza ácida o básica del desinfectante al elegir un pH óptimo de trabajo. Los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) presentes en el agua utilizada en las diluciones pueden bloquear la adsorción del desinfectante sobre la célula y de esta manera interferir en el proceso de desinfección.

Es importante recalcar que no se deben desinfectar superficies sucias, ya que la presencia de materia orgánica afecta el proceso de desinfección mediante la adsorción y/o reacción con el desinfectante, la protección física del microorganismo, o la formación de compuestos insolubles.

8.2. Evaluación de agentes desinfectantes

8.2.1. Introducción

Las primeras evaluaciones de desinfectantes datan de fines del siglo XIX, cuando Robert Koch sumergía hilos de seda inoculados con esporas de ántrax en desinfectantes, y luego evaluaba los resultados ya sea mediante cultivo de los hilos o su inoculación en animales de laboratorio.

Uno de los primeros intentos de estandarización de estas metodologías fue el trabajo de Rideal-Walker a comienzos del siglo XX, que consistía en una comparación de la actividad del desinfectante a ensayar con fenol, ya que este último era el desinfectante de mayor difusión en la época. El resultado es un cociente de actividad y recibe el nombre de "coeficiente de fenol".

Sin embargo, con la aparición y mayor disponibilidad de desinfectantes no fenólicos, las pruebas de desafíos basadas en el coeficiente de fenol fueron quedando obsoletas. A partir de un trabajo de Kelsey y Sykes, en la década del '70 se desarrollaron una serie de pruebas de desafíos que se asemejaban más a las condiciones reales de uso de los desinfectantes, además de incluir mayor variedad de agentes microbianos. Otro avance, fue incluir una etapa de neutralización de los desinfectantes luego del tiempo de exposición, ya que a diferencia de los antimicrobianos donde generalmente se evalúa capacidad inhibitoria, de los desinfectantes se espera acción netamente microbicida. Si el agente no fuera neutralizado, se cometería un error por la acción residual una vez terminado el tiempo de exposición.

A partir de allí se desarrollaron múltiples estándares nacionales tanto en América como en Europa. Afortunadamente están siendo sustituidos por estándares internacionales, lo cual simplifica la tarea de las industrias que deben demostrar la calidad de sus productos en cada uno de los países.

En Estados Unidos, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) es la institución responsable de generar las normas de evaluación de desinfectantes, y las mismas incluyen pruebas de portador (carrier test) y pruebas de dilución-uso para la actividad bactericida. Igualmente se incluyen pruebas para micobactericidas y esporicidas.

En Europa, a partir de las normas que habían sido redactadas en distintos países europeos, y luego de un extenso trabajo mancomunado y sistemático, el CEN (Comité Europeo para la Normalización), a través de su Comité Técnico TC 216, generó una serie de normas internacionales que son las de mayor difusión y adhesión en la actualidad. La metodología del CEN consta de tres fases:

Fase 1: Pruebas de suspensión cuantitativa bajo condiciones limpias, con el objetivo de determinar la actividad básica del desinfectante.

Fase 2: Evalúa las condiciones representativas de uso, aún en el laboratorio, e incluye:

- Paso 1: Prueba de suspensión cuantitativa.
- Paso 2: Prueba de superficie cuantitativa.

Fase 3: Pruebas de campo bajo las condiciones reales de uso. Es una etapa confirmatoria de los hallazgos encontrados en las fases anteriores.

Cualquiera sea la norma a considerar, la reproducibilidad de las pruebas es crítica para la interpretación apropiada de resultados. Por lo tanto es de fundamental importancia respetar estrictamente todas las condiciones de prueba expresadas en la norma.

8.2.2. Tipos de pruebas de desafíos

Pruebas en suspensión.

Estas pruebas se basan fundamentalmente en enfrentar una suspensión bacteriana estándar con el desinfectante. Se deben especificar y estandarizar el volumen y la concentración de ambos. En algunos protocolos, la suspensión bacteriana se realiza en agua con albúmina bovina para imitar las condiciones de suciedad presentes en las aplicaciones reales de un desinfectante.

Se deja actuar durante un tiempo determinado, el cual depende de la norma y del uso que se le vaya a dar al desinfectante. La temperatura debe ser constante y específica durante toda la reacción. Generalmente se trabaja a temperatura ambiente, si se dispone de temperatura controlada, pero puede realizarse a otras temperaturas dependiendo del uso final del desinfectante a probar.

Luego del tiempo de exposición se toma una alícuota, y se somete a un proceso de neutralización del desinfectante remanente con agentes específicos. Este proceso busca evitar errores de medición provocados por posibles acciones residuales luego del tiempo de exposición. (Ver figuras en la parte práctica de esta guía)

En general las distintas normas existentes proveen de tablas con los neutralizantes a usar según la estructura química del desinfectante. Se dan algunos ejemplos en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3: Ejemplos de neutralizantes para distintos desinfectantes

Desinfectante	Neutralizante
Alcoholes en gel	Tween 80, saponina, histidina y lecitina
Acido benzoico	Tween 80
Clorhexidina	Tween 80 y lecitina
Glutaraldehído	Glicina
Halógenos	Tiosulfato de sodio
Compuestos mercúricos	Acido tioglicólico

Una vez finalizado el tiempo de neutralización, se realizan una serie de diluciones y se someten a recuento microbiano. El recuento de células viables remanentes en las diluciones puede hacerse por repique en medios sólidos o por filtración con membranas. El efecto bactericida (BE por sus siglas en inglés) de un desinfectante se calcula según la siguiente fórmula:

$$BE = \log(N_C) - \log(N_D)$$

donde N_C y N_D son respectivamente los recuentos microbianos de la suspensión bacteriana estándar y el recuento de viables post tratamiento.

En general se considera que una acción desinfectante requiere de una reducción microbiana equivalente a 5 log (99,999 %). Es decir que si partimos de una población de 10^6 UFC / ml, luego del tratamiento no debemos obtener más de 10 UFC / ml.

Pruebas de capacidad

El objetivo de esta prueba es medir la capacidad de retener actividad desinfectante en situaciones donde la contaminación aumenta gradualmente, ej: mopa que se introduce repetidamente en el balde con desinfectante para pisos, o la incorporación en forma sucesiva de instrumental contaminado con fluidos potencialmente infectocontagiosos en un contenedor con lavandina.

Existen varias versiones para esta prueba, pero en líneas generales, se basa en sucesivos agregados de una suspensión bacteriana estándar sobre un volumen y dilución predeterminados de

desinfectante, a intervalos iguales y definidos. Antes de cada nuevo agregado, se realiza un repique de la mezcla para establecer el recuento de microorganismos viables.

La información aportada por las pruebas de capacidad es útil, por ejemplo, para definir la concentración de desinfectante óptima a utilizar en las condiciones de contaminación habituales de un hospital.

Pruebas de portador (carrier tests)

Son pruebas de evaluación de la desinfección de superficies. El portador o carrier es un elemento que se contamina deliberadamente de acuerdo a un procedimiento estándar. Según la norma de que se trate, el carrier puede ser un trozo de tela de algodón de 1cm², un cilindro de acero inoxidable de dimensiones estándares, entre otros. Una vez contaminado el carrier, se sumerge en la dilución del desinfectante durante un tiempo de exposición determinado y luego se neutraliza en condiciones igualmente establecidas. A continuación se transfieren los microorganismos remanentes desde la superficie del carrier a un medio de cultivo para recuento de viables. Se utilizan al menos 10 carriers para cada combinación bacteria-dilución de desinfectante por motivos estadísticos, ya que el proceso de secado de los microorganismos sobre el carrier, previo al enfrentamiento con el desinfectante, podría ya disminuir la viabilidad de los mismos, afectando así la reproducibilidad del método.

Pruebas prácticas.

Son pruebas realizadas en el laboratorio que imitan las condiciones de uso real que tendrá el desinfectante. Por ejemplo las diluciones de desinfectantes se realizan con agua dura corriente, o se le agrega materia orgánica como albúmina bovina a la suspensión bacteriana, o se utilizan como carriers los distintos tipo de superficies que deberá enfrentar el desinfectante.

Pruebas de campo

Son pruebas realizadas en el lugar y circunstancia en la que realmente se utiliza el desinfectante a probar. Son muy difíciles de estandarizar y se diseñan específicamente para ese uso en particular. Sirven como confirmación del resultado de otros tipos de pruebas. Como ejemplo podemos citar la neutralización y cultivo de muestras de desinfectantes ya utilizados (como la solución de un balde luego de la desinfección de pisos) para comprobar que el mismo permaneció activo hasta el final de su uso. Otro ejemplo sería la toma de muestra y cultivo de paredes y pisos de un quirófano, una vez desinfectado, utilizando placas RODAC (Replicate Organisms Direct Agar Contact), que son placas con medio agarizado de superficie convexa en vez de plana (ver Figura 8.2.1).

8.2.3. Pruebas para la actividad antifúngica.

Las pruebas anteriores pueden adaptarse para medir actividad antifúngica modificando los medios de cultivo utilizados y los tiempos y temperaturas de incubación. Aún existe controversia respecto a las especies a utilizar como organismos de referencia, y en cuanto a los hongos filamentosos, también falta un criterio uniforme en la utilización de suspensiones de hifas o esporas. Adicionalmente, es más dificultosa la estimación de la reducción de la viabilidad celular.

Figura 8.2.1: Placa RODAC

8.2.4. Pruebas para la actividad viricida.

Al igual que para hongos, los virus también pueden ser utilizados en estas pruebas. Entre los virus propuestos para estos tests se encuentran rotavirus, adenovirus, poliovirus, virus herpes simplex, HIV, poxvirus, papovavirus, virus de la hepatitis B y C. El mayor desafío de estos tests es la necesidad de cultivar los virus en líneas celulares, lo cual requiere tiempos, costos, recursos y condiciones de bioseguridad que no son habituales en la mayoría de los laboratorios microbiológicos.

8.2.5. Evaluación de desinfectantes sólidos.

Los desinfectantes sólidos en general están diluidos en polvos inertes. Para evaluarlos, se los aplica sobre desarrollos de los microorganismos de prueba en medios agarizados. Luego del tiempo de exposición determinado, se separa una porción del medio y se subcultiva para recuento de viables. Se realizan controles utilizando sólo el polvo inerte para verificar que este último no tenga efecto microbicida por sí mismo.

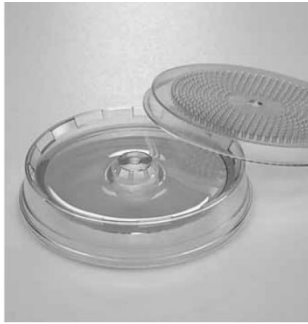
8.2.6. Evaluación de desinfectantes aéreos.

Para evaluar desinfectantes aéreos se aerosolizan los microorganismos de prueba en una cámara cerrada, se exponen al desinfectante y luego se toman muestras de aire a intervalos regulares. Los muestreadores de aire (Figura 8.2.2), son instrumentos que generan un flujo forzado de aire de volumen conocido, el cual se hace incidir directamente sobre una placa de medio agarizado. De esta manera podemos saber la cantidad de microorganismos viables por unidad de volumen de aire.

La principal dificultad está en estandarizar la contaminación inicial de la cámara y en la neutralización del desinfectante remanente en la muestra de aire.

8.2.7. Evaluación de conservantes.

La importancia de la evaluación de un producto final con conservantes radica en que el mismo podría ser neutralizado por alguno de los componentes del producto. Así mismo, cuando el producto consta de varias fases y éstas se separan, el conservante podría quedar ausente de alguna de las fases y permitir la descomposición del producto.

Figura 8.2.2: Técnica de muestreo de aire.

(a) La cámara de muestreo consiste en una placa especial con medio de cultivo, y una tapa cribada que permite el paso del aire.



(b) Acoplar la cámara de muestreo en el dispositivo.



(c) Configurar volumen de aire y velocidad de flujo.



(d) Una vez terminado el tiempo de muestreo, reemplazar la tapa cribada por un cobertor.



(e) Retirar la cámara del dispositivo e incubar.

Los métodos de evaluación son adaptaciones de las pruebas de suspensión donde se usa el producto conservado a evaluar en lugar de la suspensión de desinfectante estándar.

8.3. Parte práctica

8.3.1. Objetivo

Evaluar la capacidad de desinfección de dos enjuagues bucales según la norma EN 1040.

Primera jornada: Prueba de suspensión cuantitativa en condiciones limpias.

Microorganismos

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Materiales requeridos

Tubos Eppendorf estériles

Pipetas automáticas P200 y P1000

Tips estériles

Espátulas de Drigalski

Escala 0,5 de McFarland

Vortex

Baño termostático

Ansa recta

Gradillas para tubos Eppendorf

Solución fisiológica estéril

Agua destilada estéril

Solución neutralizante estéril (peptona 20.0 g/l; lecitina de soja 5.0 g/l; Tween 20 40 ml/l).

Placas de Petri con agar para recuento (PCA)

Procedimiento

Se realizará la evaluación de dos formulaciones de enjuague bucal. La temperatura de trabajo se fijará en 35 °C para imitar las condiciones reales de la cavidad oral, y el tiempo de exposición será de 5 min \pm 5 seg, que es el tiempo que se estima puede actuar un solución desinfectante bucal cuando no es enjuagada después de ser aplicada, hasta la desaparición completa causada por las secreciones salivales. El protocolo de trabajo se basará en la norma europea EN-1040.

Realizar una suspensión de turbidez equivalente a 0,5 McFarland de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*. Esta debe ser utilizada dentro de los 15 minutos de preparada.

En los **tubos de prueba** (Figura 8.3.1) se enfrentarán 800 μ l de desinfectante, 100 μ l de agua destilada estéril y 100 μ l de suspensión bacteriana. Agitar bien en vórtex e incubar los tubos en un baño termostático a 35 °C.

Luego de 5 min de exposición, retirar los tubos del baño, agitar en vortex y transferir 100 μ l de su contenido a un segundo tubo con 800 μ l de solución neutralizante y 100 μ l de agua destilada estéril. Luego de una nueva incubación de 5 min a 35 °C, agitar en vortex y transferir 100 μ l de su contenido a un tercer tubo con 900 μ l de solución fisiológica estéril. Tanto del tubo 2

como del 3, previa agitación en vortex, sembrar por duplicado 100 µl en placas con agar para recuento. Distribuir el inóculo parejamente en toda la superficie de la placa con una espátula de Drigalski. Incubar las placas durante 24 h a 35 °C en aerobiosis.

En forma simultánea, para hacer el **control del recuento bacteriano inicial** (Figura 8.3.2), realizar seis diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril de la suspensión bacteriana, como muestra la figura correspondiente. Realizar de los tubos 5 y 6 repiques por duplicado de 100 µl en placas con agar para recuento. Distribuir con espátula de Drigalski e incubar 24 h a 35 °C.

En el tubo de **control de toxicidad del neutralizante** (Figura 8.3.3), realizar una dilución de la suspensión bacteriana con agua destilada estéril, equivalente a la que se produce en el tubo prueba. Ver figura correspondiente. Inmediatamente después, agitar en vortex y transferir 100 µl de la dilución a un segundo tubo con 800 µl de neutralizante y 100 µl de agua destilada. Agitar bien e incubar en baño termostático durante 5 min a 35 °C.

Al finalizar la incubación realizar cinco diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril, y realizar de los tubos 6 y 7 repiques por duplicado de 100 µl en placas con agar para recuento. Distribuir con espátula de Drigalski e incubar 48 h a 35 °C.

En el tubo de **control de eficacia del neutralizante** (Figura 8.3.4), enfrentar 800 µl de desinfectante con 200 µl de agua destilada estéril, agitar y someter a la misma incubación que el tubo prueba. Luego de la incubación, agitar y transferir 100 µl a un segundo tubo con 800 µl de neutralizante y 100 µl de agua destilada estéril. Agitar e incubar 5 min a 35 °C en baño termostático. Agregar 100 µl de suspensión bacteriana, agitar y repetir la incubación. Luego realizar cinco diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril, y de los tubos 6 y 7 repicar por duplicado 100 µl en placas con agar para recuento. Distribuir con espátula de Drigalski e incubar 48 h a 35 °C.

Segunda jornada: Cuantificación del desarrollo y ejecución de los cálculos.

Materiales requeridos

Lupa para recuento

Marcador indeleble

Calculadora

Procedimiento

Realizar el conteo de UFC en todas las placas incubadas y calcular el recuento microbiano teniendo en cuenta las diluciones hechas en cada caso. Revisar que el recuento de los controles de eficacia y toxicidad coincidan con el del control de recuento de la suspensión bacteriana. Calcular el BE utilizando los recuentos del tubo prueba y del control de recuento de la suspensión bacteriana, mediante la fórmula expuesta anteriormente. Concluir si las soluciones desinfectantes probadas cumplen con el requisito de disminución mínima de la carga microbiana equivalente a 5 log.

8.4. Bibliografía

Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology / edited by Stephen Denyer, Norman A Hodges, Sean P Gorman. 7th ed. (2004) Ed Blackwell Science.

Figura 8.3.1: Tubo prueba

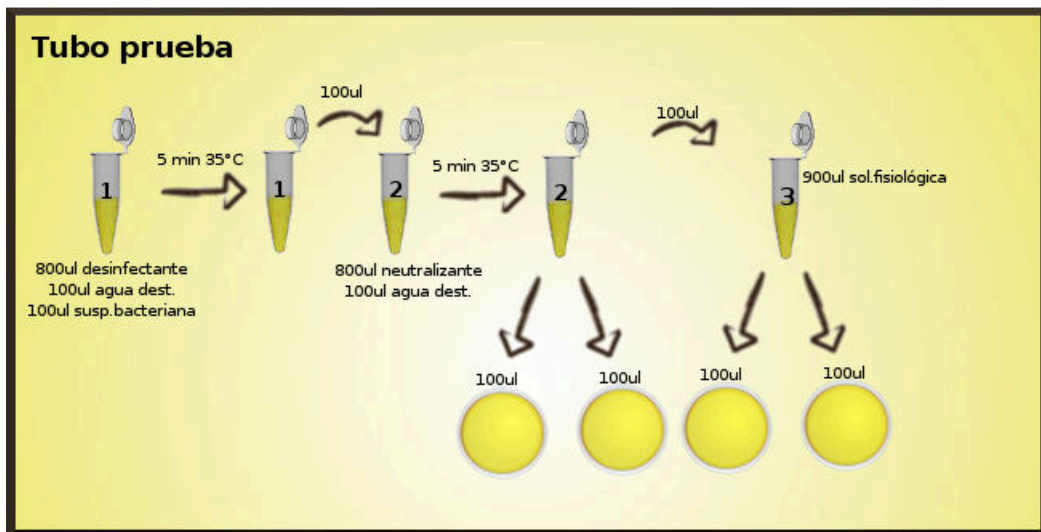


Figura 8.3.2: Control de recuento bacteriano total.

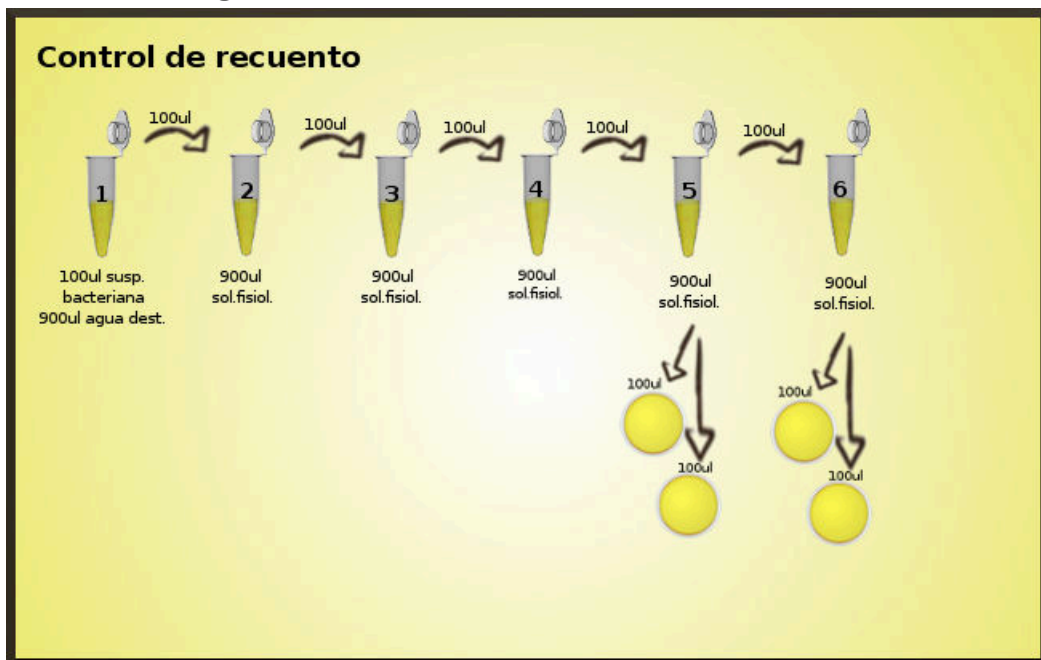


Figura 8.3.3: Control de toxicidad del neutralizante

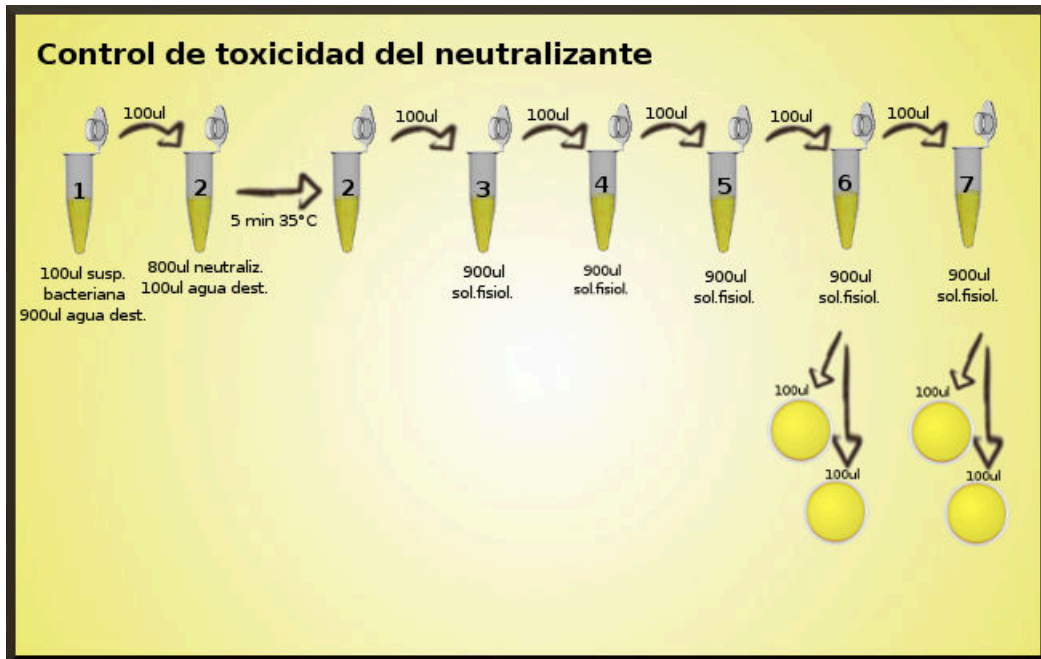
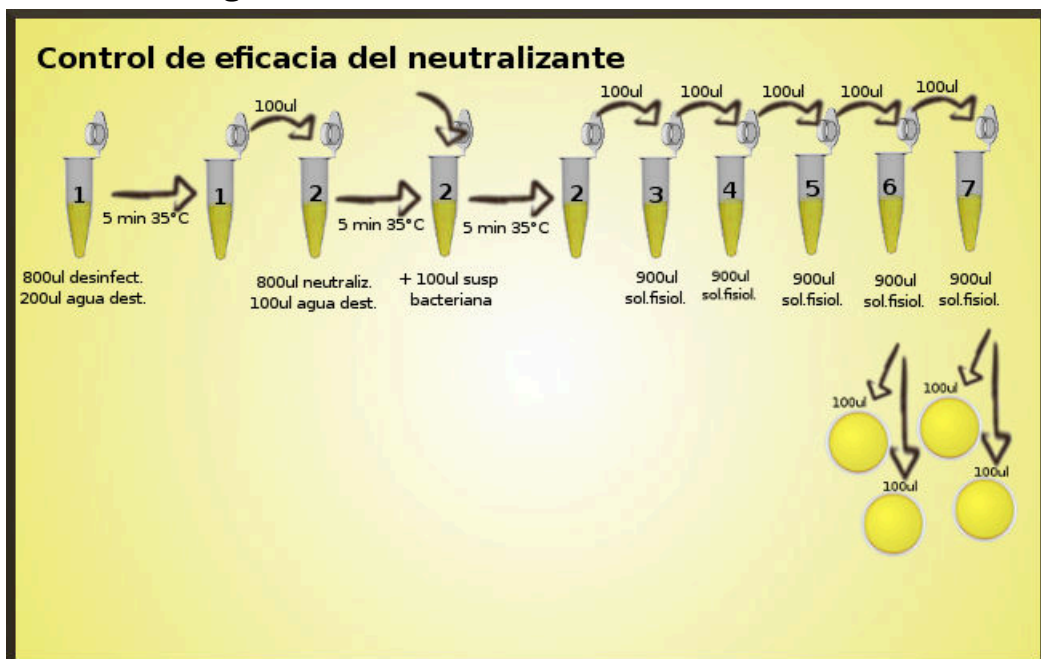


Figura 8.3.4: Control de eficacia del neutralizante



Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, edited by Adam P. Fraiese, Peter A Lambert, Jean-Yves Maillard. 4th ed. (2004) Ed Blackwell Science.

Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos. H Cerra, MC Fernández, C Horak, M Lagomarsino, G Torno, E Zarankin. (2013) Asoc Arg de Microbiol.

9 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

9.1. Introducción

Los antimicrobianos son sustancias producidas por microorganismos o por síntesis química, que en bajas concentraciones inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Por ejemplo, la penicilina es un antibiótico de origen microbiano, mientras que las quinolonas son sustancias sintéticas o de origen no microbiano.

En las ciencias de la salud, los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos son utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, destruyendo o inhibiendo al microorganismo patógeno y evitando dañar al hospedador. A esto se le llama “toxicidad selectiva”.

La elección de un antibiótico en la terapia de una infección depende de diversos factores:

- Tipo de microorganismo (obtenido por cultivo o sospechado por el contexto epidemiológico),
- Sensibilidad del agente patógeno (obtenida por antibiograma o supuesta según epidemiología)
- Gravedad y localización de la infección
- Toxicidad del principio activo
- Antecedentes de hipersensibilidad en el paciente
- Costo

En algunas ocasiones, el tratamiento de una infección puede requerir la combinación de dos antibióticos para alcanzar el objetivo terapéutico.

9.2. Tipos de actividad antimicrobiana

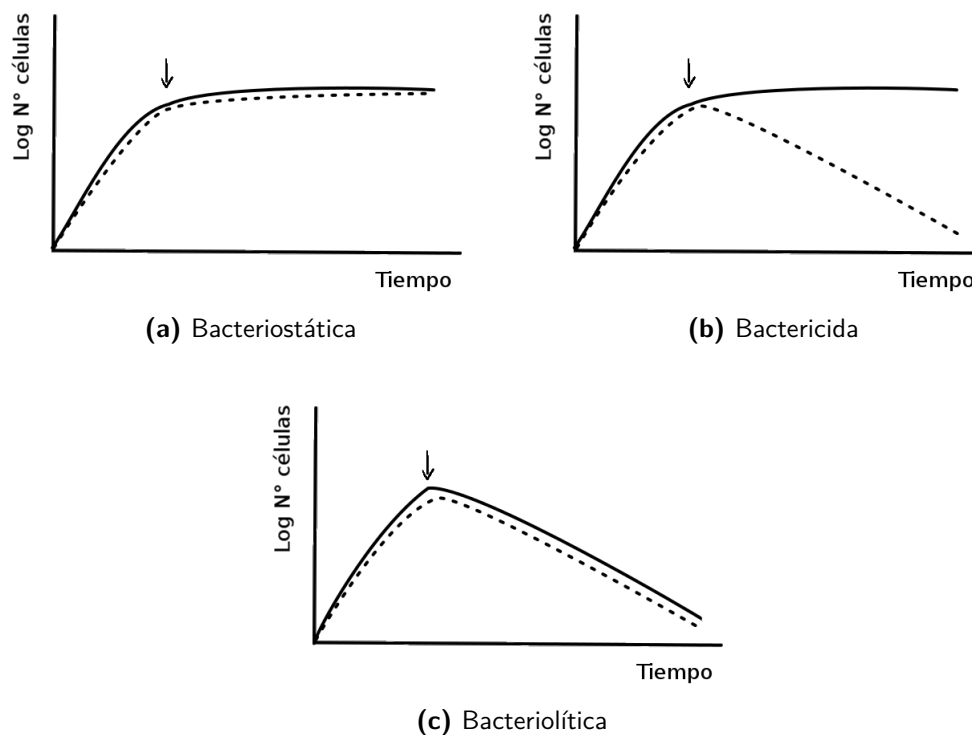
Cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo (bacteriano o fúngico) en fase exponencial de crecimiento, pueden observarse tres posibles efectos:

Bacteriostático o fungistático: cuando se inhibe el crecimiento pero las células no mueren. El número de células viables y células totales se mantienen constantes en el tiempo luego del agregado del agente antimicrobiano (Figura 9.2.1a).

Bactericida o fungicida: cuando se mueren las células sin que ocurra la lisis o rotura de las mismas. El número de células viables disminuye, mientras que el número de células totales permanece constante luego del agregado del agente antimicrobiano (Figura 9.2.1b).

Bacteriolítico o fungilítico: la célula se muere por lisis, la rotura celular se detecta por un descenso del número de células totales (estimadas por densidad óptica), luego de añadir el agente antimicrobiano. El número de células viables y totales disminuyen. (Figura 9.2.1c).

Figura 9.2.1: Tipos de actividad de las sustancias antimicrobianas. Se añadió el agente antimicrobiano en una concentración inhibitoria, a un cultivo en fase exponencial de crecimiento, en el tiempo indicado por la flecha. Células totales: trazo continuo, células viables: trazo punteado.



9.3. Mecanismos moleculares de acción de los antimicrobianos

Los distintos tipos de actividad antimicrobiana tienen efecto a través de diferentes mecanismos a nivel molecular. En general, los antibióticos interfieren en determinadas reacciones metabólicas de los microorganismos:

1. Inhiben la síntesis de la pared celular. Ej.: penicilinas, cefalosporinas, cicloserina, equinocandina.
2. Alteración de la permeabilidad o de la síntesis de la membrana celular. Ej.: polimixina, daptomicina, imidazoles, terbinafina.
3. Inhibición de la síntesis de ADN. Ej.: quinolonas, ácido nalidíxico, ciprofloxacina.
4. Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (ribosomas). Ej.: aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas.
5. Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana (ácido fólico). Ej.: sulfonamidas, trimetoprima.

Con frecuencia, los **agentes bacteriostáticos** son inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. No obstante, dicha unión no es fuerte y cuando disminuye la concentración del agente, al antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento. Los **agentes bactericidas** son agentes químicos que se unen fuertemente a sus dianas celulares y no se eliminan por dilución. Dentro de los **agentes bacteriolíticos** se incluyen los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, como la penicilina y los compuestos químicos que lesionan la membrana citoplasmática.

9.4. Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad son ensayos que estiman el grado de susceptibilidad o resistencia de un microorganismo en particular a uno o más antimicrobianos.

Las técnicas actualmente utilizadas para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos son producto de importantes esfuerzos internacionales que desde hace ya varias décadas están enfocados a normatizar el método. Como normas internacionales más importantes se pueden resaltar las de EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* o Comité Europeo sobre pruebas de sensibilidad antimicrobiana) y las de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* o Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios). Además de normatizar los métodos, dichas instituciones también generan tablas de interpretación de resultados, con actualizaciones periódicas, para uso en contextos de diagnóstico clínico. En Argentina y en la mayoría de los países latinoamericanos se siguen las pautas del CLSI con algunas modificaciones.

9.4.1. Determinación de actividad inhibitoria

Pruebas de dilución

Las técnicas de dilución, se pueden utilizar para medir *cuantitativamente* la actividad “in vitro” de un antimicrobiano frente a un cultivo microbiano y constituyen el método de referencia para la determinación de la actividad inhibitoria de los antimicrobianos. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos con caldo o placas con agar, a los cuales se les agrega el antibiótico en concentraciones crecientes. Luego se inoculan cada uno de estos tubos o placas con una suspensión estándar del microorganismo ensayado.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM): es la menor concentración del agente antimicrobiano, capaz de inhibir la multiplicación del microorganismo. Se expresa en $\mu\text{g} / \text{ml}$.

El valor de la CIM (concentración inhibitoria mínima) obtenido por estos métodos, da una orientación respecto de la concentración de antibiótico necesaria en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante, y se ve representada por el tubo o placa con menor concentración de antimicrobiano que evidencia ausencia de turbidez o desarrollo.

El antimicrobiano puro puede obtenerse directamente del laboratorio productor o de otras fuentes comerciales que provean junto con la droga, el número de lote, la potencia (generalmente expresada en μg o UI / mg de polvo) y la fecha de vencimiento. No se recomienda la utilización de las preparaciones para aplicación parenteral. Debe almacenarse según las recomendaciones del productor, generalmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se deben preparar soluciones madres de

por lo menos 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o de una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango a estudiar y conservarse en alícuotas a -20°C por 6 meses o más.

Prueba de dilución en caldo:

A partir de la solución madre del antimicrobiano, se realizan diluciones seriadas al medio en tubos de hemólisis estériles con caldo Mueller Hinton (MH).

Luego se realiza una suspensión del microorganismo a estudiar, de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Dicha escala se prepara agregando 0,5 ml de BaCl_2 0,048 M (1,75 % p/v $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1 % v/v). Y después se realiza una dilución 1/100 de esta suspensión en caldo MH. Con esta dilución se inoculan los tubos con antimicrobiano.

Además se preparará un tubo sin inocular, que servirá como **control de esterilidad** del caldo MH; y otro tubo con inóculo pero sin antimicrobiano, que servirá de **control de desarrollo** (o control de crecimiento).

Se incuba de 18-24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y se observa el desarrollo bacteriano, evidenciado por la turbidez de los tubos.

El microorganismo crecerá en el tubo control de crecimiento y en todos los otros que no contengan suficiente antimicrobiano para inhibir el desarrollo.

Existe un micrométodo donde se utilizan policubetas estériles en lugar de tubos de hemólisis, y los volúmenes de antimicrobiano e inóculo se ajustan proporcionalmente.

Prueba de dilución en agar:

En este caso, las diluciones de antimicrobiano se agregan al agar fundido y entibiado, antes de volcar en las placas de Petri.

Dependiendo del volumen que inocule el replicador utilizado en esta técnica, la suspensión bacteriana equivalente al tubo 0,5 de Mc Farland, deberá o no, diluirse en 1/10. La siembra se realiza en forma de gota o *spot*.

Tiene como ventaja el hecho de poder estudiar numerosas cepas en forma simultánea en cada placa.

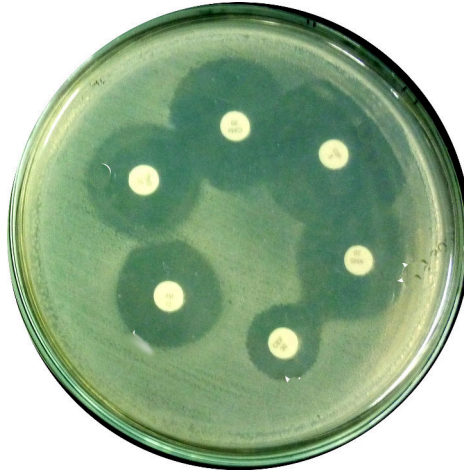
Pruebas de difusión

Antibiograma. Técnica según Kirby-Bauer.

Es el método más accesible y de uso común en los laboratorios de diagnóstico clínico. Se basa en los estudios de Bauer y col. y es un método *cuantitativo* que le asigna al aislamiento microbiano alguna de las categorías descritas en sec. 9.4.1.

Consiste en enfrentar el microorganismo problema sembrado en forma de “césped” sobre una placa de agar, a distintos antimicrobianos almacenados en reservorios (generalmente discos de papel). Cuando estos discos se depositan sobre la superficie del agar, el antimicrobiano difunde hacia el medio en todas direcciones, formando un gradiente circular de concentración, siendo el borde del disco la zona de mayor concentración de antimicrobiano. Alrededor del reservorio se formará eventualmente una zona de inhibición del crecimiento cuyo diámetro dependerá principalmente de la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano estudiado (Figura 9.4.1).

Otros factores fundamentales que influyen en el diámetro de inhibición son:

Figura 9.4.1: Halos de inhibición de monodiscos en placa de Petri

- La carga de antimicrobiano en el disco: se deben usar discos con el diámetro y la concentración de antimicrobiano con que fue estandarizada la técnica. Por lo mismo es importante que los discos se encuentren dentro de su período de vigencia y se almacenen refrigerados y protegidos de exceso de humedad. Los discos de penicilinas y cefalosporinas se deben almacenar a -20° para conservar su potencia.
- El espesor de la capa de agar: Se vierte el agar fundido en placas estériles en cantidad suficiente para obtener una altura de $4 \pm 0,2$ mm. Esto es importante para evitar halos, excesivamente reducidos o ampliados.
- pH y composición del agar: Se utiliza como medio de cultivo el agar Mueller-Hinton (MH), considerado el mejor para las pruebas de sensibilidad ya que muestra buena reproducibilidad lote a lote, contiene bajo nivel de inhibidores para determinados antibióticos y permite un desarrollo adecuado en la mayoría de los microorganismos patógenos. Para eliminar la humedad se colocan las placas recién preparadas de 15 a 30 min en estufa de cultivo a 35°C , ya que no debe haber gotas de condensación en el agar ni en la tapa. Las placas así preparadas y empaquetadas herméticamente, pueden conservarse entre 4 y 8°C de 4 a 7 días.
- La capacidad de difusión de la droga en ese medio: La difusión del antimicrobiano dependerá de su tamaño molecular, polaridad, etc.
- La temperatura de incubación: La temperatura es $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y es importante ya que influye tanto en la velocidad de difusión del antimicrobiano como en la velocidad de duplicación del microorganismo.
- La velocidad de duplicación bacteriana.
- El tamaño y fase de crecimiento del inóculo: El inóculo se debe preparar a partir de un cultivo en fase exponencial (de 18 a 24 h de incubación). La turbidez obtenida deberá ajustarse agregando solución fisiológica o desarrollo bacteriano, según sea necesario, para igualar la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. En situaciones especiales, en las que no se dispone de cultivo fresco en fase exponencial, o cepas en las que resulte difícil lograr suspensiones homogéneas, puede utilizarse como alternativa la inoculación de un tubo con un caldo apropiado y su incubación hasta obtener la turbidez adecuada. Sin embargo, este método (con desarrollo previo) sólo es apto para bacterias no fastidiosas.

El antibiograma ha sido estandarizado para microorganismos de rápido crecimiento (ej.: *Staphy-*

lococcus aureus, Enterobacterias y *P. aeruginosa*), y ha sido modificado para probar microorganismos nutricionalmente exigentes (ej.: *Haemophilus*, *N. gonorrhoeae*).

Método epsilométrico

Es un método simple, *cuantitativo*, desarrollado comercialmente, de determinación de la CIM. Consiste en una tira de nylon con un gradiente lineal de concentraciones de antimicrobiano. Cuando la misma se dispone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio, se forma luego del tiempo de incubación, un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la concentración inhibitoria mínima puede ser leída directamente sobre la tira (Figura 9.4.2). Este es el método de elección para hacer estudios de susceptibilidad en gérmenes problemáticos o con requerimientos especiales, como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *H. influenzae* y gérmenes anaeróbicos.

Figura 9.4.2: Determinación de la CIM por el método epsilométrico.



Interpretación e informe de resultados

Según el valor de la CIM o del diámetro de halo del antibiograma, una cepa bacteriana puede ser asignada a alguna de las siguientes categorías:

Sensible (S): La cepa es inhibida a las concentraciones de antimicrobiano que se obtienen generalmente con las dosis recomendadas para el sitio de infección.

Sensible Dosis Dependiente (SDD): La sensibilidad de la cepa depende del régimen posológico utilizado en el paciente. Para que el tratamiento de estas cepas sea clínicamente efectivo, deberán utilizarse dosis mayores y/o más frecuentes, con el fin de obtener una concentración sérica mucho mayor que las utilizadas para definir la categoría de "sensible".

Intermedio (I): Esta categoría incluye cepas cuyas CIM son cercanas a las concentraciones séricas de antimicrobiano posibles de obtener y cuyas respuestas al tratamiento pueden ser menor que las de las cepas sensibles. Puede obtenerse eficacia clínica en sitios de infección donde la droga se concentra fisiológicamente (ej.: quinolonas y betalactámicos en orina), o cuando pueden utilizarse dosis de antimicrobianos mucho mayores de las habituales (ej.: betalactámicos). Esta categoría también incluye una zona buffer para prevenir que pequeños factores técnicos que se escapen de control puedan causar discrepancias graves en la interpretación de resultados.

Resistente (R): Estas cepas no son inhibidas con regímenes posológicos habituales. También puede tratarse de cepas cuyos valores de CIM están relacionados con una alta probabilidad de presentar determinados mecanismos de resistencia (ej.: betalactamasas).

No sensible (NS): Existen antimicrobianos para los cuales aún no se han aislado cepas resistentes que permitan definir puntos de cortes de resistencia y por lo tanto existen únicamente criterios de sensibilidad. Las cepas con CIM superiores al punto de corte de sensibilidad deben ser informadas como “no sensibles”, sin embargo esto no significa necesariamente que posean algún mecanismo de resistencia.

Los puntos de corte, o valores que separan una categoría de otra, son determinados por comités de expertos dentro de las instituciones normativas, basándose en la información acumulada internacionalmente respecto de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los antimicrobianos, evoluciones clínicas de los pacientes con los distintos tratamientos y posologías, y características poblacionales de cada especie bacteriana. En esta tarea, es fundamental el aporte del farmacéutico, desde su conocimiento de la farmacología de los antimicrobianos.

Las tablas donde se recopilan los puntos de corte para cada combinación antimicrobiano-especie bacteriana son actualizadas anualmente, y tienen el siguiente formato tipo (Tabla 9.1).

Tabla 9.1: Formato tipo de las tablas de interpretación de resultados de pruebas de sensibilidad para una determinada especie bacteriana o grupo taxonómico.

Grupo de informe	Antimicrobiano	Contenido del disco	Criterio de interpretación. Diámetro de inhibición (mm)			Criterio de interpretación. CIM (µg / ml)			Comentarios
			S	I	R	S	I	R	
A	Piperacilina	100 µg	≥21	15-20	≤14	≥16	32-64	≤128	

9.4.2. Determinación de actividad bactericida

Normalmente, el objetivo de un tratamiento antimicrobiano es limitar la multiplicación del microorganismo infectante, para que la inmunidad del hospedador pueda actuar. Sin embargo, existen situaciones como las endocarditis y osteomielitis, en las cuales la llegada de las defensas del hospedador al sitio de infección se ve obstaculizada. Otro ejemplo son las infecciones en pacientes inmunocomprometidos, donde es necesario que la actividad del antimicrobiano sea bactericida y no sea sólo inhibitoria.

Concentración bactericida mínima

CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM): Corresponde a la menor concentración de antimicrobiano capaz de matar un 99,9 % de la población bacteriana.

Técnicamente, la CBM se obtiene transfiriendo una alícuota de 100 µl de los tubos de la CIM donde el microorganismo fue inhibido (tubos lípidos) a placas con agar. Luego de una nueva incubación se deberá realizar un recuento de colonias, y la CBM corresponderá a la concentración del tubo que evidenció una disminución de 3 logaritmos respecto del inóculo inicial.

Curvas de muerte

Se enfrentan una solución de antimicrobiano y un inóculo bacteriano estándar en un volumen fijo de caldo MH. Durante la incubación se toman alícuotas, usualmente a las 4, 8 y 24 h, para obtener los recuentos de colonias a distintos tiempos. Con los valores obtenidos se realizan gráficas donde no sólo se demuestra la presencia o ausencia de actividad bactericida, si no además su magnitud y su cinética.

Poder bactericida del suero

Esta prueba es equivalente a la determinación de la CBM, pero utilizando muestras de suero del paciente en tratamiento correspondientes al pico y al valle de las concentraciones séricas de antimicrobiano, en reemplazo de la solución madre de antimicrobiano.

9.5. Parte práctica: Pruebas de sensibilidad "in vitro"

9.5.1. Objetivos

1. Determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana a diferentes agentes antimicrobianos mediante la técnica de antibiograma.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria de un antimicrobiano para una cepa bacteriana mediante la técnica de dilución en caldo.

9.5.2. Antibiograma

Día 1

Preparación de las placas:

Distribuir el medio de cultivo fundido y enfriado a 45-50 °C (Agar Mueller-Hinton) en cajas de Petri adecuadamente rotuladas hasta una altura de 4 mm (aproximadamente 25 ml por placa). Una vez solidificadas, secar las placas colocándolas abiertas e invertidas 10 a 30 min en estufa a 35 °C.

Preparación del inóculo:

Se toman 4 o 5 colonias del microorganismo bien aisladas y de igual morfología y suspender en 1-2 ml de solución fisiológica estéril. En este tubo se deberá obtener una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland.

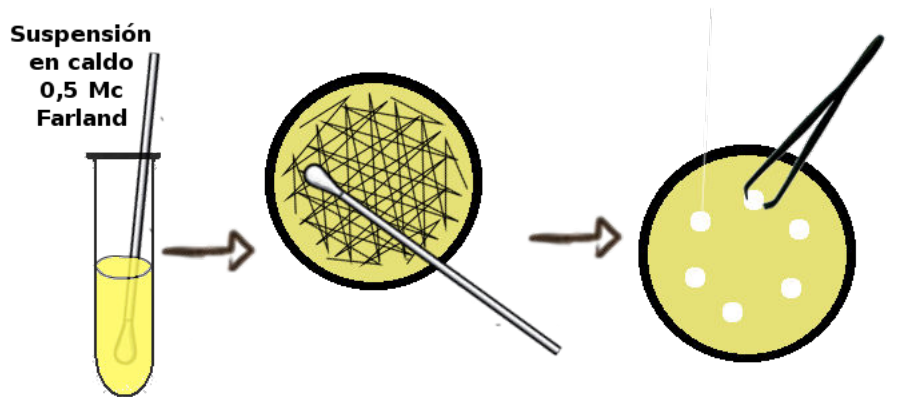
Siembra de las placas:

Sumergir un hisopo en la suspensión bacteriana, y luego eliminar el exceso de líquido presionando ligeramente el hisopo contra las paredes internas del tubo. Aplicar sobre las placas, estriando toda la superficie del agar. Repetir el hisopado en otras dos direcciones diferentes. Terminar recorriendo con el hisopo todo el perímetro de la placa. Es importante la aplicación homogénea del inóculo en la superficie del agar dado que una aplicación deficiente conducirá a la obtención de halos de inhibición con bordes poco nítidos y mediciones poco precisas. Esperar entre 3 a 5 min y no más de 15 min antes de aplicar los discos, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Ver Figura 9.5.1.

Aplicación de los discos:

Tomar los discos con una pinza flameada y colocarlos en el agar cuidando que tengan un buen contacto con la superficie, ejerciendo una ligera presión para no romper el agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa y a una distancia no menor a 24 mm entre sí. En placas de 100 mm de diámetro no deben colocarse más de 6 discos. Si se excede su número o no se respetan las distancias mínimas, puede que ocurra superposición de halos, lo que dificulta la lectura y provoca errores de medición. Ver Figura 9.5.1.

Figura 9.5.1: Antibiograma



Enterobacterias: ampicilina (AM), ampicilina-sulbactam (AMS), cefalotina (CEF), cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftacidima (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IM), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP).

Pseudomonas: piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftacidima (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP).

Staphylococcus: gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), cefoxitina (FOX), amikacina (AMK), oxaciclina (OXA), rifampicina (RIF), eritromicina (ERY), clindamicina (CD).

Incubación:

Antes de que transcurran 15 min de inoculadas, incubar las placas invertidas, en grupos no superiores a 5 placas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16 a 18 h.

Día 2

Resultados:

Con un calibre o una regla, medir el diámetro de los halos de inhibición incluyendo el disco de 6 mm y comparar con la tabla correspondiente de la CLSI.

9.5.3. CIM por dilución en caldo (macrométodo).

Día 1

Preparación de la solución del antibiótico

Pesar 10 mg del antibiótico ampicilina y llevar a volumen en matraz aforado de 10 ml con agua destilada estéril (solución stock de $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$). En el momento de usar se diluye 1/10 con agua destilada estéril (solución de trabajo de $100 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Preparación del inóculo

A partir de cultivos puros en agar nutritivo de diferentes bacterias se prepara una suspensión en solución fisiológica ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de Mc. Farland. Diluir esta suspensión 1/100 colocando $100 \mu\text{l}$ en $9,9 \text{ ml}$ de caldo Mueller-Hinton que será usada como inóculo.

Preparación de las diluciones del antibiótico

Con una pipeta de 1 ml tomar 0,5 ml de la solución de trabajo del antibiótico ($100\mu\text{g}/\text{ml}$), y agregar a los tubos rotulados 1 y 2 (50 y $25\mu\text{g}/\text{ml}$), cargando y descargando dos veces la pipeta para homogeneizar. Con la misma pipeta de 1 ml tomar 0,5 ml del tubo 2 y descargar en el tubo 3 ($12,5\mu\text{g}/\text{ml}$). Repetir el procedimiento anterior para el resto de las diluciones ($6,25$; $3,12$; $1,56$; $0,78$; $0,39$; $0,195$; $0,09$; $\mu\text{g}/\text{ml}$) y descartar 0,5 ml de la última dilución. Ver Tabla 9.2.

Tomar una gradilla con 12 tubos de hemólisis estériles rotulados adecuadamente. Colocar 0,5 ml de caldo Mueller-Hinton (CMH) (utilizando una pipeta de 10 ml) en cada uno de los tubos, dejando el primero vacío. El tubo 11 será el control de inóculo (control de crecimiento) que contenga caldo más inóculo, y el tubo 12 el control de esterilidad (tubo que contenga solamente caldo).

Siembra e incubación

Sembrar cada uno de los tubos que contienen las diluciones con 0,5 ml de inóculo excepto el control negativo. El volumen final será de 1 ml. Incubar 24 h a 37°C .

Día 2

Resultados:

Al finalizar la incubación, agitar los tubos en vortex y verificar que los controles de esterilidad y de crecimiento estén correctos. Luego determinar el tubo con menor concentración de antimicrobiano que permaneció límpido (CIM) y comparar con la tabla correspondiente de la CLSI.

9.6. Bibliografía

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Curso de Microbiología Clínica. Antimicrobianos. Módulo 4. Segunda edición. Asociación Argentina de Microbiología, 2008.

Brock. Biología de los Microorganismos. 12ª Edición. Michael T. Madigan y col. 2009.

Tabla 9.2: Técnica de dilución en caldo para determinación de la CIM.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195	0,09		
Paso 1 Caldo Mueller Hinton		0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	1ml
Paso 2 Solución de trabajo de Ampicilina	0,5ml	0,5ml										
Paso 3 Diluciones seriadas			↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	↪ 0,5ml	
Paso 4 Inóculo dilución 1/100	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	

10 Producción y detección de compuestos bioactivos microbianos de interés farmacéutico.

La mayoría de los productos farmacéuticos obtenidos por fermentaciones microbianas son metabolitos secundarios que frecuentemente se acumulan después de que el crecimiento exponencial ha finalizado. Desempeñan diferentes funciones en la naturaleza, tales como antibióticos, toxinas, ionóforos, biorreguladores, entre otras. Generalmente estos compuestos son obtenidos de un grupo de hongos y bacterias relativamente restringido, siendo los principales productores los hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Cephalosporium* junto a los actinomicetes (un grupo extenso de bacterias filamentosas Gram-positivas, donde *Streptomyces* es el género más importante). Otros taxones bacterianos como *Bacillus* y *Pseudomonas*, y en menor proporción las mixobacterias y cianobacterias constituyen un grupo reducido de organismos que secretan metabolitos secundarios.

En su mayoría son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan una amplia complejidad en sus estructuras químicas, de modo que resulta difícil reemplazar la fermentación por la síntesis química en la producción de estos compuestos. Sin embargo, algunas de sus propiedades, tales como la solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad y metabolización requieren posteriores modificaciones estructurales. Por lo tanto, luego de su obtención se realizan a menudo transformaciones químicas o enzimáticas de los metabolitos microbianos para optimizar su farmacocinética y farmacodinámica.

En general, un objetivo primordial de la industria es maximizar los rendimientos cuantitativos y cualitativos (pureza química) de la línea productora debido a que los metabolitos secundarios se producen en bajas cantidades por los microorganismos silvestres.

Los antibióticos son el grupo de metabolitos secundarios de mayor importancia farmacéutica producidos por microorganismos. (Ver ejemplos en Tabla 1.1). Desde que Alexander Fleming accidentalmente descubriera la penicilina en 1928, estos inhibidores del crecimiento microbiano han revolucionado las ciencias médicas.

La fabricación industrial de muchos antibióticos se basa en la producción a gran escala de microorganismos. Este proceso se conoce comúnmente como fermentación. Aunque las fermentaciones son procesos biológicos que ocurren en ausencia de oxígeno, el término también se aplica a cualquier cultivo a gran escala de microorganismos, ya sea aerobio (con oxígeno) o anaerobio (sin oxígeno).

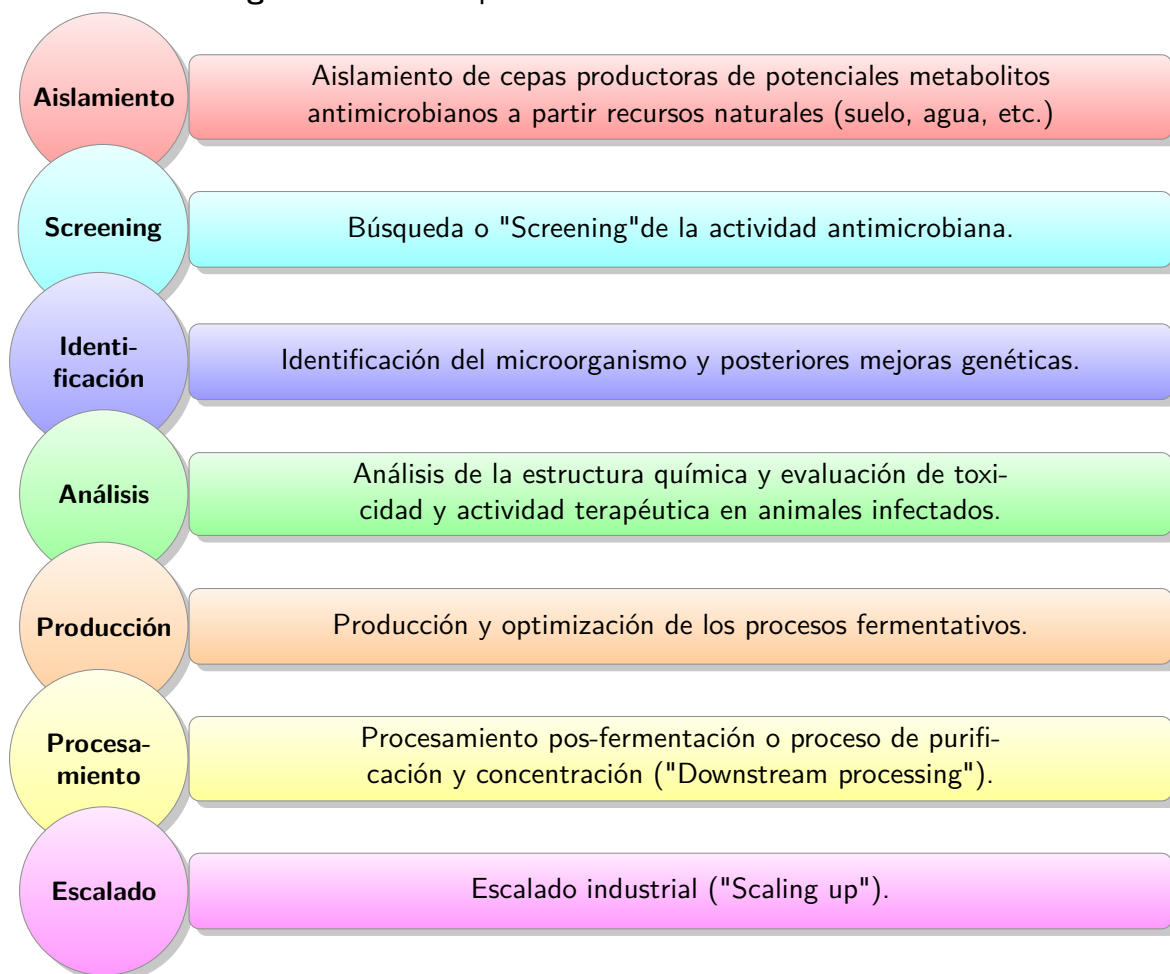
Desde un punto de vista biotecnológico, la venta mundial de antibióticos β -lactámicos producidos por fermentación industrial se puede estimar en aproximadamente 15000 millones de dólares (un 65% de la venta total de antibióticos), lo cual lo convierte en el producto biotecnológico más importante del mundo.

En la Figura 10.0.1 se pueden observar las etapas más relevantes en el desarrollo de nuevos antibióticos.

Tabla 10.1: Algunos antibióticos producidos comercialmente.

Antibiótico	Microorganismo productor		
	Hongo	Actinomiceto	Bacteria
Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i>		
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>		
Cefalosporinas	<i>Cephalosporium sp</i>		
Cloranfenicol		<i>Streptomyces venezuelae</i> ^a	
Cicloheximida		<i>Streptomyces griseus</i>	
Cicloserina		<i>Streptomyces orchidaceus</i>	
Eritromicina		<i>Streptomyces erythreus</i>	
Neomicina		<i>Streptomyces fradiae</i>	
Estreptomina		<i>Streptomyces griseus</i>	
Tetraciclina		<i>Streptomyces rimosus</i>	
Nistatina		<i>Streptomyces noursei</i>	
Bacitracina			<i>Bacillus licheniformis</i>
Polimixina B			<i>Bacillus polymyxa</i>
Gramicidina D			<i>Bacillus brevis</i>
Tirotricina			<i>Bacillus brevis</i>

^a Actualmente producido por síntesis química

Figura 10.0.1: Etapas del desarrollo de nuevos antibióticos.

10.1. Aislamiento de la cepa productora

Aunque la industria farmacéutica actualmente realizan gran parte de la búsqueda y descubrimiento de nuevos medicamentos a través del modelado por computadora, la forma tradicional por la que se descubren nuevos antibióticos consiste en la búsqueda (screening) de microorganismos productores de antibióticos aislados de la naturaleza. Existe una enorme variedad de diseños experimentales diferentes para esta búsqueda, pero en general, los métodos utilizados se basan en la dilución de la muestra, la siembra en medios agarizados y el enfrentamiento con algún microorganismo sensible que sirve de indicador de la potencial actividad antimicrobiana. (Ver Figura 10.1.1.) Luego se aíslan estas cepas con actividad y se realizan cultivos puros para el posterior estudio de las mismas.

Figura 10.1.1: Siembra de una muestra ambiental donde se observa una colonia que ejerce una acción inhibitoria sobre los microorganismos que lo rodean.



10.2. Búsqueda de la actividad antimicrobiana

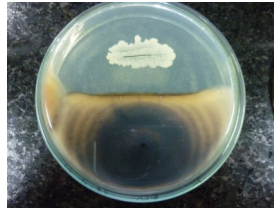
Luego de la obtención de los cultivos puros, se evalúa la secreción de los compuestos bioactivos observando la producción de cualquier sustancia difusible que inhiba el crecimiento de diversos microorganismos patógenos utilizados como indicadores.

La detección de la actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos indicadores puede realizarse mediante:

Enfrentamiento de dos microorganismos en medio de cultivo sólido

Este procedimiento clásico fue utilizado por primera vez por Alexander Fleming. En este método se realiza la siembra en superficie (en placa) tanto del microorganismo productor como los microorganismos indicadores (Figura 10.2.1). Cuando el microorganismo en estudio produce compuestos activos frente al microorganismo indicador, este último muestra una zona de inhibición en su desarrollo.

Figura 10.2.1: Enfrentamiento de *B. amyloliquefaciens* productor de compuestos bioactivos y un mocho (indicador).



Evaluación de sobrenadantes libres de células

Para evaluar si los potenciales antibióticos son liberados al medio, se utilizan sobrenadantes libres de células (SLC) del microorganismo productor, obtenidos a partir del crecimiento en medios de cultivo líquidos.

En el caso de microorganismos esporulados también deben separarse las esporas del sobrenadante. De este modo se elimina la posibilidad de que una spora germine en el medio sólido liberando antibióticos que no fueron secretados en el medio líquido inicial

1. *Técnicas de difusión en placa:* En ellas se utilizan diferentes metodologías
 - a) Difusión en discos: el sobrenadante conteniendo el antibiótico se distribuye en discos que luego se colocan sobre una placa con medio de cultivo agarizado, previamente sembrada con distintos microorganismos indicadores (Figura 10.2.2 A).
 - b) Difusión en hoyos o pocillos ("*well diffusion method*"): el sobrenadante se descarga directamente en pocillos efectuados en el medio de cultivo agarizado, luego de que los microorganismos indicadores hayan sido inoculados (Figura 10.2.2 B).
 - c) Difusión por gota: una gota del sobrenadante se coloca directamente sobre la placa de medio agarizado ya sembrada con los microorganismos indicadores (Figura 10.2.2 C).
2. *Bioautografía:* Está técnica combina la cromatografía plana (en papel o en capa fina) y el método de difusión. Permite una separación preliminar de los compuestos antimicrobianos y el cálculo de un factor de retención (R_f) característico (Figura 10.2.3).

Figura 10.2.2: Métodos de detección de actividad antimicrobiana de SLC. A: difusión en disco, B: difusión en hoyos o pocillos, C: difusión por gota.

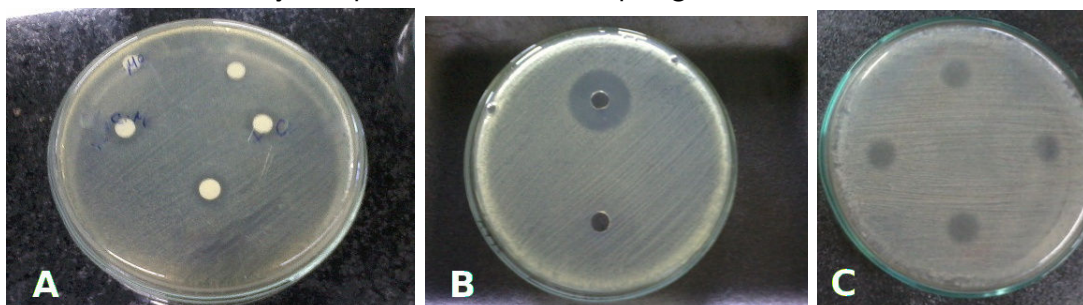
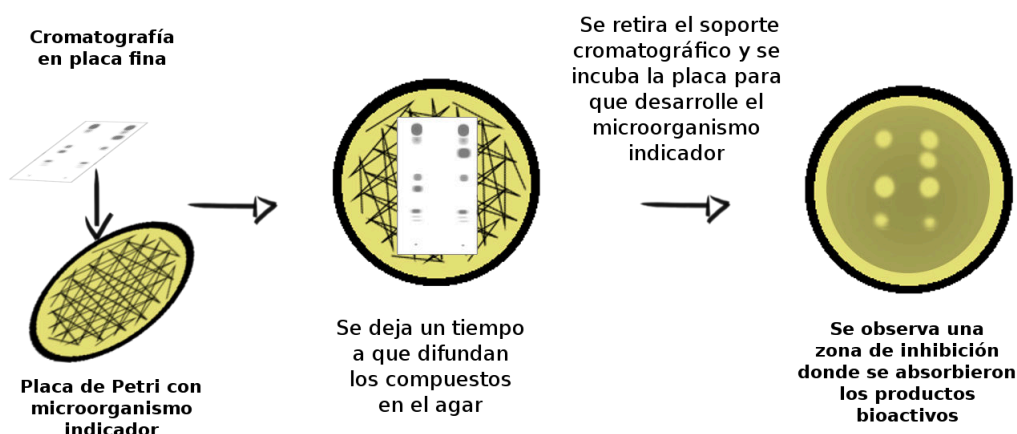


Figura 10.2.3: Bioautografía.



10.3. Identificación del microorganismo y mejoramiento genético

La identificación del microorganismo se realiza a través de una serie de pruebas bioquímicas, microscópicas y moleculares que permiten la caracterización fenotípica y genotípica del microorganismo aislado. Debido a que dicho organismo naturalmente produce el antibiótico de interés en escasa proporción, deben emplearse métodos de mejoramiento genético de las cepas. Los programas tradicionales de modificación genética involucran una creación forzada de mutaciones en el ADN microbiano utilizando radiaciones UV, rayos X o mutágenos químicos (ej: nitrosoguanidina - NTG) y posterior selección de mutantes con alta producción.

Los mutágenos químicos dan los mejores resultados y tienen un efecto mutagénico efectivo en comparación a la capacidad de muerte; sin embargo, deben ser manipulados cuidadosamente por su elevado poder carcinogénico. Tales programas usan recursos muy selectivos diseñados alrededor de las vías de biosíntesis de los antibióticos o sobre el metabolismo del microorganismo. Una estrategia más útil en tal programa de mejoramiento sería reagrupar las potencialidades de distintas variantes con el objeto de seleccionar la mejor combinación de genes responsables de codificar la producción de determinado metabolito. A partir de 1977 con los trabajos de Hopwood se muestra que es posible lograr la recombinación genética, definiendo como tal a cualquier proceso que genere nuevas combinaciones de genes los cuales estaban originalmente en individuos diferentes.

A partir del análisis de la secuencia genómica de las bacterias, no sólo se puede intuir con cuántos genes y cuántas proteínas puede contar determinado microorganismo, sino también cuáles son esenciales para vivir, al menos, en condiciones de laboratorio. Así se puso en evidencia que muchos de los genes que tienen que ver con la síntesis de envolturas son esenciales y no tanto los genes regulatorios.

Del análisis de las proteínas esenciales y de su posible configuración, se pueden "diseñar" nuevos antibióticos. Las envolturas siguen siendo el blanco preferido. Ese ha sido también el blanco de un nuevo antibiótico recientemente caracterizado producido por *Streptomyces platensis* cuya novedad consiste en afectar la síntesis de los ácidos grasos que componen la membrana.

Otra alternativa evaluada por estudios recientes donde es importante conocer más de la genómica de la bacteria a eliminar, ha sido la de limitar la capacidad mutagénica interfiriendo con los genes responsables de sus mecanismos de reparación.

10.4. Análisis de la estructura química y evaluación de toxicidad y actividad terapéutica en animales infectados

La identificación de la estructura química se realiza mediante técnicas analíticas instrumentales (RMN, IR, EM, etc). A pesar de ser numerosos los nuevos antibióticos desarrollados, la mayoría fallan en los test de experimentación en animales y solo unos pocos tienen eficacia terapéutica aceptable para la producción comercial.

10.5. Producción y optimización de los procesos fermentativos

La velocidad y cantidad de antibióticos producidos depende de:

- Factores nutricionales: la fuente de carbono seleccionada, la relación carbono - nitrógeno en el medio de cultivo, la presencia y concentración de sales inorgánicas y factores de crecimiento. La composición del medio afecta directamente la producción de antibióticos por interferencia de mecanismos de control metabólico o por su rol como precursores de las vías biosintéticas.
- Factores físico-químicos: pH del medio, presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono disuelto, temperatura de incubación. Estos factores influyen indirectamente sobre la producción por regulación de la velocidad de crecimiento microbiano.

La manipulación de estos factores permite optimizar la producción de antibiótico por unidad de masa microbiana o por unidad de tiempo.

10.6. Procesamiento post-fermentación

Corresponde a un conjunto de etapas empleadas en la separación y purificación de las biomoléculas obtenidas durante la fermentación:

Separación: constituye operaciones de recuperación primaria para la separación de la masa celular a partir del caldo de cultivo, la eliminación de los desechos celulares y la recolección del producto de interés. Los métodos comúnmente utilizados son la centrifugación y la filtración. La filtración con membranas de 0,22 μm de poro permite la eliminación de esporas que no pueden separarse del líquido por centrifugación.

Concentración: luego de la separación de las células del medio de cultivo, el filtrado contiene hasta un 98 % de agua, con el antibiótico como un constituyente minoritario. La remoción del agua es un proceso costoso que puede realizarse de diferentes maneras: evaporación, filtración por membranas (ósmosis reversa, microfiltración y ultrafiltración), extracción líquido-líquido y precipitación (sulfato de amonio, acetona, etanol, HCl, etc), entre otros. La elección del método dependerá de la naturaleza del producto, minimizando la pérdida en las distintas etapas.

Purificación: La cromatografía es la técnica más utilizada en los procesos de purificación, incluyendo a la cromatografía de exclusión, de intercambio iónico y de afinidad entre los sistemas más eficientes.

10.7. Escalado industrial

Durante el proceso de escalado desde la fermentación en un erlenmeyer hasta la producción a gran escala, es necesario realizar una serie de ajustes de las condiciones de trabajo. Esto requiere gran conocimiento no sólo de la biología del microorganismo productor, sino de la física del diseño y funcionamiento del fermentador, que permitirá medir y controlar las distintas variables puestas en juego durante el proceso de fermentación, como son la transferencia de gases, la dinámica de fluidos, el mezclado y la termodinámica.

10.8. Parte práctica

10.8.1. Objetivos

- Producir un sobrenadante libre de células y esporas (SLCE) en cultivo discontinuo de *B.amyloliquefaciens* SL-6.
- Evaluar la actividad antagónica de la cepa anterior sobre distintos microorganismos indicadores, mediante método de estría.
- Detectar la actividad antagónica de SLCE, por método en hoyos (well difussion method), sobre aquellos microorganismos que resultaron sensibles.
- Estudiar la actividad hemolítica de la cepa productora de antibióticos en agar sangre.

10.8.2. Producción de metabolitos activos en sobrenadante de cultivos de *B.amyloliquefaciens* SL-6

Materiales requeridos

Erlenmeyers indentados de 250 ml
 Agitador orbital
 Cámara de cultivo con temperatura controlada
 Centrífuga refrigerada
 Tubos de centrífuga estériles
 Filtros estériles de acetato de celulosa 0,22 μm
 Micropipetas y tips estériles
 Tubos Eppendorf estériles

Procedimiento

Cultivo discontinuo

La producción de metabolitos bioactivos se llevará a cabo en un medio de cultivo de composición química definida:

Caldo sintético mineral (CSM)

ÁcidoL-glutámico	5,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g
NaCl	0,01 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01 g
Glucosa	10,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	7

Preparación del inóculo

1. Colocar 5 ml de CSM en un inóculo de *Bacillus* en TSA inclinado y remover la masa celular hasta obtener una suspensión densa y homogénea.
2. Adicionar 0,9 ml de dicha suspensión en un elermeyer indentado estéril con 45 ml de CSM.
3. Cultivar a 30°C durante 24 h con agitación a 200 rpm.

Obtención del Sobrenadante libre de células y esporas (SLCE)

1. Separar el cultivo en dos tubos y centrifugar a 12.000 rpm, durante 20 min a 4°C.
2. Filtrar el sobrenadante obtenido utilizando una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro.
3. Recuperar el SLCE, manteniendo en todo momento la técnica aséptica.

10.8.3. Sondeo de la actividad antimicrobiana utilizando una cepa bacteriana autóctona

Microorganismos:

B.amyloliquefaciens SL-6 (antagonista)

Microorganismos indicadores

- *E. coli*
- *S. aureus*
- *P. aeruginosa*
- *S. cerevisiae*
- *Rhodotorula sp*
- *C. albicans*
- Mohos

Materiales requeridos

Placas de Petri estériles

Tubos de ensayos estériles

Ansas rectas y en anillo

Hisopos

Escala 0,5 de McFarland

Agar Peptonado Glucosado pH 7 (APG)

Agar Sabouraud pH 5.6 (Sab)

Solución fisiológica estéril (SF)

Procedimiento

Preparación de los microorganismos indicadores:

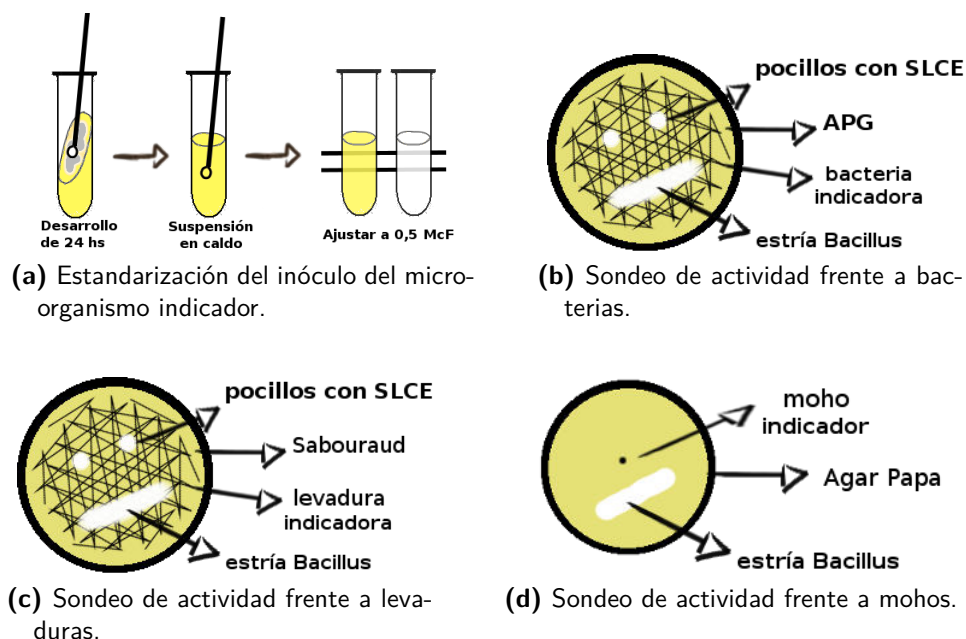
Tomar una ansada de biomasa de cada uno de los distintos microorganismos indicadores provistos (excepto mohos). Pasar dicha biomasa a sendos tubos con solución fisiológica y ajustar la turbidez con la escala 0,5 de McFarland. Ver Figura 10.8.1 (a).

Bacterias indicadoras: Sumergir un hisopo estéril en la suspensión bacteriana y descartar el exceso de líquido oprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo. Sembrar con el hisopo ya escurrido, *estriando uniformemente en tres direcciones distintas* sobre placas de Petri conteniendo Agar Peptonado suplementado con Glucosa (APG). Ver Figura 10.8.1 (b).

Levaduras indicadoras: Sumergir un hisopo estéril en la suspensión de levadura y proceder de la misma manera que para bacterias pero sembrando sobre placas de Petri conteniendo Agar Sabouread (Sab). Ver Figura 10.8.1 (c).

Mohos indicadores: Efectuar una siembra puntual en el **centro** de la placa de Agar Papa. Ver Figura 10.8.1 (d).

Figura 10.8.1: Sondeo de la actividad antimicrobiana de *B. amyloliquefaciens* SL-6.



Siembra de *B. amyloliquefaciens* SL-6:

Realizar con el ansa una estría del microorganismo antagónico, de 1 a 2 cm de longitud, en posición central para bacterias y levaduras, y lateralmente a 2 cm del microorganismo indicador en el caso de mohos. Ver Figura 10.8.1.

Enfrentamiento con sobrenadante libre de células y esporas (SLCE).

Realizar utilizando un sacabocados estéril dos hoyos en cada placa de Petri pre-inoculada con bacterias o levaduras y depositar en los mismos en forma aséptica 20 μ l del SLCE. Ver Figura 10.8.1 (b) y (c).

Incubación y lectura de los resultados obtenidos:

Incubar las placas con bacterias a 37 °C durante 24 h, a 30 °C durante 24 a 48 h las levaduras

y durante a 30°C durante 5 a 7 días los mohos. Medir los halos de inhibición en aquellos casos que se manifieste la actividad inhibitoria.

10.8.4. Efecto hemolítico de la cepa antagonista

Debido a que los péptidos cíclicos con actividad antibiótica producidos por las especies de *Bacillus* muestran actividad hemolítica variable, es de suma importancia comprobar que los nuevos compuestos no exhiban dicha actividad. Esta falta de actividad hemolítica sugerirá que el compuesto no posee efecto citotóxico para el hospedador.

Materiales requeridos

Agar sangre

Ansa en anillo

Procedimiento

Se investigará si existe efecto hemolítico sembrando por estría sobre una placa de agar sangre. El medio agar sangre se utiliza para diferenciar bacterias en función de sus características hemolíticas.

Fundamento: Varias especies de bacterias producen exotoxinas llamadas hemolisinas, capaces de destruir los glóbulos rojos y la hemoglobina. El medio Agar sangre incluye 5 % de sangre de oveja sobre una base de agar de tripticasa de soja, permitiendo la diferenciación de las bacterias sobre la base de su capacidad de hemólisis de glóbulos rojos.

Los tres tipos principales de hemólisis son:

- Hemólisis α : destrucción parcial de los glóbulos rojos, se observa un halo verdoso alrededor de las colonias, debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.
- Hemólisis β : lisis completa de los eritrocitos y la hemoglobina se traduce en un halo claro alrededor de las colonias.
- Hemólisis γ : ausencia de hemólisis, solo se observa el crecimiento sin cambio en el medio de cultivo.

10.9. Bibliografía

Brock. Biología de los Microorganismos. 12ª Edición. Michael T. Madigan y col. 2009.

Basic Biotechnology 2ª Edición. Ratledge C. y Kristiansen B. 2001.

Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. 1ª Edición. Lancini G., Parenti F., Gallo G.G. 1995.

Monografía: Microbiología Industrial. Programa Regional de Desarrollo científico y Tecnológico de la OEA. Rodolfo Ertola y col. 1995.

11 Detección de mecanismos de resistencia antimicrobiana

11.1. Introducción

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido reconocida desde la introducción de los primeros fármacos para su uso clínico. Las sulfonamidas se utilizaron a partir de 1935 y aproximadamente 10 años después, el 20 % de los aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* se había convertido en resistentes. Incrementos similares se encontraron en los estreptococos, coliformes y otras bacterias. La penicilina fue utilizada por primera vez en 1941, siendo apenas el 1 % de las cepas de *S. aureus* resistentes a su acción. En 1947, el 38 % de las cepas hospitalarias había adquirido la resistencia y en la actualidad, más del 90 % presentan tal característica. El aumento de la resistencia a los antibióticos es una consecuencia de la presión selectiva, pero la incidencia real varía entre diferentes especies bacterianas. Por ejemplo, resistencia a la ampicilina en *E. coli*, presumiblemente bajo una presión selectiva similar de *S. aureus* a la penicilina, se ha mantenido en un nivel de 30 a 40 % durante muchos años con una tasa de aumento lento. *S. pyogenes*, otro de los principales patógenos, es susceptible a la penicilina desde su introducción, sin reportes de resistencia en la literatura científica. Igualmente, es bien reconocido que ciertas bacterias no son afectadas por los antibióticos específicos. En otras palabras, estas bacterias han sido siempre resistentes a los antibióticos. La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicancias sociales y económicas enormes dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas. Varios son los factores que han contribuido a su aparición:

- La presión selectiva ejercida por el uso terapéutico de antibióticos en humanos y animales, tanto por prescripción formal como por libre empleo de los mismos.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la microbiota local de cada institución o comunidad.
- La falta de cumplimiento del tratamiento.

11.2. La resistencia intrínseca y adquirida

La resistencia a los antibióticos se clasifica en dos tipos generales: intrínsecos y adquiridos.

11.2.1. Resistencia intrínseca

Esto sugiere que las propiedades inherentes de la bacteria son responsables de la prevención de la acción antibiótica. Este tipo de resistencia también se denomina innata o natural. Hay muchos antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas que no tienen ningún efecto sobre las bacterias Gram-negativas y viceversa (Tabla 11.1).

Tabla 11.1: Espectro de actividad de algunos antibióticos antibacterianos.

Antimicrobiano	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Penicilina	Estreptococos, estafilococos, clostridios, <i>Listeria</i>	Anaerobios
Ac fusídico	<i>S. aureus</i>	
Eritromicina	Estreptococos, estafilococos, corinebacterias	<i>Legionella</i> , <i>Campylobacter</i>
Vancomicina	Estreptococos, estafilococos, clostridios	
Aminoglucósidos	<i>S. aureus</i>	Coliformes, <i>Pseudomonas</i>
Ac Nalidíxico		Coliformes
Polimixina		Coliformes, <i>Pseudomonas</i>
Metronidazol	Anaerobios	

En algunos casos, esta resistencia intrínseca está asociada con la membrana externa de las células Gram-negativas que actúa como una estructura impermeable evitando que ciertos antibióticos lleguen a sus dianas.

11.2.2. Resistencia adquirida

Ocurre cuando las bacterias que antes eran susceptibles al agente antimicrobiano se vuelven insensibles, después de la exposición al antibiótico en cuestión. La resistencia intrínseca está siempre mediada cromosómicamente, mientras que la resistencia adquirida pueden producirse por mutaciones en el cromosoma o por la adquisición de nuevos genes que codifican para la resistencia mediante transferencia horizontal de los mismos.

Las mutaciones a nivel cromosómico pueden ser clasificadas en función del tipo de cambio producido:

Transiciones: implican la sustitución de una purina por otra (A o G) o una pirimidina por otra (C o T).

Transversiones: implican un cambio a partir de una pirimidina a una purina y viceversa.

Mutaciones de desplazamiento del marco: se producen cuando una o dos bases se insertan en la secuencia de ADN que resulta en un marco de lectura alterada y por lo tanto un producto alterado.

Macrolesiones: alteraciones más grandes en la secuencia de ADN.

Deleciones: es la pérdida de parte de la secuencia de ADN.

Inserciones: añadir pares de bases adicionales a un gen.

Duplicaciones: se producen cuando se repite un segmento del ADN.

Tanto la resistencia intrínseca como la adquirida son clínicamente importantes y pueden resultar en el fracaso del tratamiento terapéutico, aunque las consecuencias de la última son mayores por constituir una amenaza por la propagación de la resistencia a los antibióticos.

11.3. Elementos involucrados en la transferencia horizontal de la resistencia.

Los elementos genéticos son responsables de la transferencia horizontal de la resistencia a antimicrobianos: plásmidos, transposones e integrones.

11.3.1. Los plásmidos

El cromosoma bacteriano contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y la replicación de las células. Muchas bacterias también poseen elementos circulares adicionales de ADN que son capaces de replicar y transferir independientemente del cromosoma. Estos elementos genéticos extracromosómicos son conocidos como plásmidos y pueden codificar para un número de propiedades que incluyen resistencia a los antibióticos. En una población bacteriana, no es necesario para todas las células presenten plásmidos. Suponiendo que un subconjunto de la población bacteriana contiene tales elementos genéticos, la presión selectiva después de la exposición a un antibiótico producirá la supervivencia de la población que contiene el plásmido y su progenie tras el desafío antibiótico.

Los plásmidos tienen la capacidad de transferirse dentro de una especie o entre especies, de modo que pueden ser adquiridos como una consecuencia de la división celular o bien como una transferencia horizontal de genes. Esto hace a la resistencia adquirida por plásmidos mucho más amenazante en términos de la propagación de resistencia a los antibióticos que la resistencia adquirida debido a la mutación cromosómica.

La transferencia del plásmido se produce normalmente por conjugación, transducción y transformación.

Conjugación: requiere un contacto de célula a célula y consiste en la transferencia de ADN a partir de una célula donante a una célula receptora. Los plásmidos que pueden mediar su propia transferencia se denominan plásmidos conjugativos. Algunos plásmidos que no poseen esta propiedad, sin embargo pueden ser transferido si conviven con un plásmido conjugativo. Estos son conocidos como plásmidos movilizables. Tanto las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas tienen la capacidad de conjugarse.

Transducción: es un proceso por el cual el ADN se transfiere por bacteriófagos, y juega un importante papel en la transferencia de la resistencia a los antibióticos en bacterias Gram-positivas tales como *S. aureus*, *S. pyogenes* y los enterococos. La transducción se limita generalmente a los organismos de la misma especie y por lo tanto, su papel en la transferencia de la resistencia al antibiótico es menos importante que la conjugación.

Transformación: Es la capacidad de los ciertos microorganismos para la adquisición de ADN desnudo desde el medio ambiente. Esto se limita a ciertas bacterias, en particular *N. gonorrhoeae*, que es naturalmente competente para adquirir ADN de esta manera. Cepas de *N. gonorrhoeae* tienen la capacidad de reconocer el ADN de su propia especie, volviéndose selectivos en su adquisición de ADN desnudo desde el medio ambiente. La transducción y la transformación son generalmente limitados a los mismos organismos de una especie.

11.3.2. Los transposones

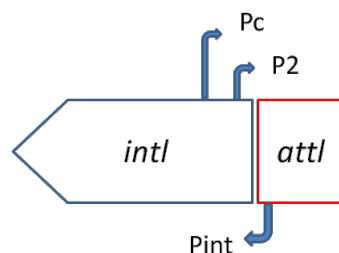
Son elementos genéticos móviles capaces de transferir independientemente una secuencia de ADN a otra. Los transposones son normalmente flanqueados por regiones cortas de secuencia de ADN idéntica conocidas como repeticiones. Estas repeticiones se cree que funcionan como secuencias de reconocimiento para enzimas implicadas en la transposición. Estas enzimas son las Transposasas que pueden estar codificadas dentro del elemento transponible o fuera de él. Las Transposasas catalizan el movimiento del transposon por un mecanismo de corte y unión. La región central del transposón a menudo contiene genes que codifican para la resistencia a antibióticos. La capacidad de los transposones de movilizar a partir de una molécula de ADN a otra ha llevado a que se conozcan como genes saltarines.

11.3.3. Los integrones

Los integrones son unidades de captura génica que contienen los elementos necesarios para la recombinación sitio-específica y la expresión de DNA foráneo. La estructura mínima de un integrón incluye:

1. el gen para la integrasa (*intI*),
2. un sitio adyacente de recombinación (*attI*),
3. al menos un promotor (P_c , P_2), orientado para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor (P_{int}) y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados (Figura 11.3.1). La integrasa, que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas, es la que cataliza la recombinación entre las secuencias específicas.

Figura 11.3.1: Estructura básica de un integrón. Tomado de Di Conza y col.



Los integrones se han clasificado según la secuencia de su integrasa, pero en la actualidad se prefiere clasificarlos según su localización. Se habla, en general, de “integrones móviles” para referirse a aquellos asociados a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos, los que en su mayoría median mecanismos de resistencia, y de “superintegrones”, de localización cromosómica y con grandes arreglos de genes asociados a múltiples funciones adaptativas.

Estos elementos no son móviles por sí mismos, pero su asociación con elementos que sí lo son facilita su transferencia horizontal, lo que explica su amplia difusión entre las bacterias.

11.4. Mecanismos de resistencia adquirida

Existen cinco mecanismos de resistencia adquirida. Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo:

11.4.1. Destrucción o modificación enzimática del antibiótico.

La inactivación de los antibióticos por vía enzimática es el mecanismo de resistencia más eficiente que existe, generalmente otorga al microorganismo que lo posee altos niveles de resistencia al/los antimicrobiano(s) afectado(s).

El principal exponente de este mecanismo lo constituyen las β -lactamasas, un grupo de enzimas producidas por gran diversidad de especies de Gram-positivos, Gram-negativos y anaerobios, y que tienen la capacidad de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico. Este grupo incluye una amplia variedad de enzimas con distintas estructuras y perfiles de afinidad por sustratos, como las penicilinasas con afinidad por las penicilinas únicamente, las cefalosporinasas con mayor afinidad por cefalosporinas que por penicilinas, las betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) activas frente a penicilinas y cefalosporinas de primera generación, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) cuya actividad incluye también cefalosporinas de segunda y tercera generación, cefepimasas que hidrolizan cefalosporinas de cuarta generación, y carbapenemasas que inactivan prácticamente a todos los grupos de betalactámicos.

Estas enzimas pueden ser codificadas por genes en los cromosomas o en plásmidos. En términos generales, las β -lactamasas de las bacterias Gram-positivas son excretadas al medio exterior, pero en las Gram-negativas se encuentran concentradas en el espacio periplásmico, lo cual aumenta su eficacia.

Existen agentes betalactámicos como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, que actúan como “inhibidores suicidas” de las betalactamasas. Es decir, forman una unión covalente con dichas enzimas en lugar de ser hidrolizados. Como resultado, las betalactamasas que son susceptibles a estos agentes, son neutralizadas por los mismos, por lo cual son utilizados en muchas formulaciones farmacéuticas en combinación con otros betalactámicos clásicos.

Existen diversos criterios por los cuales pueden clasificarse las betalactamasas. Las dos clasificaciones más difundidas utilizan como parámetros el perfil de sustratos de las enzimas, la susceptibilidad a inhibidores, localización cromosómica o plasmídica de los genes y las propiedades fisicoquímicas. En la Tabla 11.2 puede observarse la complejidad y diversidad de este gran grupo de enzimas.

Tabla 11.2: Clasificación de betalactamasas. Tomado de Bush-Jacoby (2010).

Clasificación Bush-Jacoby	Clasificación Ambler	Perfil de sustratos	Inhibible por		Características	Enzimas más representativas
			CLAV o TAZ	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilina; hidroliza cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1

Continúa

Clasificación Bush-Jacoby	Clasificación Ambler	Perfil de sustratos	Inhibible por		Características	Enzimas más representativas
			CLAV o TAZ	EDTA		
1e	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis aumentada de ceftazidima y otros oximino- β -lactámicos	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilina que de cefalosporinas	PC1
2b	A	Penicilinas y cefalosporinas de primera generación.	Si	No	Similar hidrólisis of bencilpenicilina y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactams	Si	No	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactams	No	No	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos combinada con resistencia a ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Si	No	Hidrólisis aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3

Continúa

Clasificación Bush-Jacoby	Clasificación Ambler	Perfil de sustratos	Inhibible por		Características	Enzimas más representativas
			CLAV o TAZ	EDTA		
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis aumentada de carbenicilina, cefepime, y cefpirome	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis aumentada de cloxacilina u oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	Hidroliza cloxacilina u oxacilina y oximino-β-lactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemes	Variable	No	Hidroliza cloxacilina u oxacilina y carbapenemes	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidroliza cefalosporinas. Inhibida por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis aumentada de carbapenemes, oximino-β-lactámicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1), B (B3)	Carbapenemes	No	Si	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenemes pero no monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemes	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenemes	CphA, Sfh-1

Continúa

Clasificación Bush-Jacoby	Clasificación Ambler	Perfil de sustratos	Inhibible por		Características	Enzimas más representativas
			CLAV o TAZ	EDTA		
NI	Desconocida				Enzimas descubiertas recientemente, de las que se desconocen sus características.	

CLAV: Ácido clavulánico; TAZ: Tazobactam; NI: No incluida

La destrucción o inactivación por enzimas afecta principalmente a los antibióticos que son productos naturales, tales como las penicilinas y las cefalosporinas. Grupos químicos totalmente sintéticos de antibióticos tales como las fluoroquinolonas son menos propensos a ser afectados de esta manera, a pesar de que pueden ser neutralizados de otras maneras. Esto puede simplemente reflejar que los microbios han tenido un menor tiempo a adaptarse a las estructuras químicas desconocidas.

Otros ejemplos de modificaciones enzimáticas de antimicrobianos son:

- la acetiltransferasa que degrada al cloranfenicol
- la esterasa que degrada el anillo de lactona de la eritromicina
- las fosfatasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas que inactivan a los aminoglicósidos

11.4.2. Impermeabilidad al antibiótico.

Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglicano. Además de una capa pequeña de peptidoglicano en las bacterias Gram-negativas, se conoce una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de la membrana externa llamadas porinas (OMP). Estas porinas varían en número, tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de dicha estructura hacia el espacio periplásmico. Muchas bacterias Gram-negativas naturalmente no permiten el paso de moléculas hidrofóbicas como la eritromicina a través de la membrana externa por la presencia de lipopolisacáridos. Otro mecanismo de resistencia son las mutaciones en las porinas, que conlleva a cambios en su estructura o en el número impidiendo el ingreso de los medicamentos; este es el caso de *P. aeruginosa* que mediante una mutación de la porina OprD, hace que no se encuentre este transportador en la membrana, adquiriendo resistencia al imipenem por impedir el ingreso a la bacteria.

La resistencia intrínseca de bacterias como *P. aeruginosa* y *Enterococcus* se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las ya existentes influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo cual se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana externa.

11.4.3. Alteración de sitios blanco

Los cambios en los sitios blancos del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos que se usan en clínica, pues evitan el efecto bactericida o bacteriostático. La alteración ó modificación del sitio de unión del antimicrobiano se traduce en una pérdida de la afinidad y por tanto lo imposibilita para realizar la destrucción del microorganismo. Esta mutación se puede dar a nivel de los ribosomas (modificación del sitio diana intracelular) como ocurre con la resistencia a macrólidos y lincosamidas (clindamicina), en la que la adición de grupos metilo a la unidad 50S del ribosoma impide la acción de los medicamentos. Este mecanismo esta descrito en anaerobios y *S. aureus*.

La modificación del sitio diana puede ser extracelular como ocurre con la resistencia de *S. aureus* y *S. pneumoniae*, que se da por modificación de la enzima blanco en la pared bacteriana, mediante la presencia de un gen *mecA*, que codifica una PBP modificada (PBP2a), para la cual no tienen afinidad los antibióticos betalactámicos. Esta estrategia de disminución de afinidad por las PBP, también la presentan el *H. influenzae* y la *Neisseria meningitidis*.

11.4.4. Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico.

Consiste en bombas de reflujo de medicamentos dependiente de energía (expulsa el antibiótico una vez que ha entrado a la bacteria) Se comporta como la bomba de sodio/potasio, que actúa en contra de un gradiente de concentración, pero en este caso no intercambia electrolitos, sino que expulsa antibióticos. Los altos niveles de resistencia se deben a la sobreproducción intrínseca de estas bombas de reflujo o a la adquisición extrínseca de genes que los codifican. Ejemplos de transportadores específicos son las bombas de expulsión de antibióticos de la familia de los macrólidos y lincosaminas, que le dan la resistencia al neumococo contra estos antibióticos; otros ejemplos de este tipo de resistencia lo muestran las bacterias *E. coli* que mediante una bomba de reflujo de antibióticos se hace resistente a la tetraciclina, eritromicina y algunas fluoroquinolonas, y *P. aeruginosa* que adquiere multiresistencia mediante sobreexpresión de genes de reflujo.

11.4.5. Modificación de la Vía Metabólica

El ejemplo clásico de este mecanismo es la resistencia a las sulfonamidas las cuales utilizan una vía metabólica alterna para la síntesis de ácido fólico, y así evitar la acción del medicamento. Algunos antibióticos son capaces de inhibir específicamente la actividad de algunas enzimas esenciales para la célula. Por ejemplo la sulfamida inhibe la dihidropteroato sintasa, una enzima esencial en la síntesis de ácido fólico que las bacterias necesitan para poderse dividir. Sin embargo, algunas bacterias pueden utilizar una via metabolica secundaria y de esa manera sobrevivir. Además, puede ocurrir que determinados plásmidos R porten genes de resistencia a las sulfamidas (Su^R), que codifican una dihidropteroico sintetasa muy resistente a la acción de estos quimioterápicos, debido a que tienen una afinidad 10 000 veces menor que la enzima normal codificada por el cromosoma.

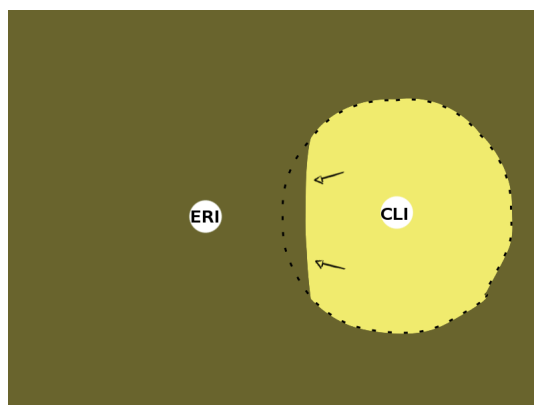
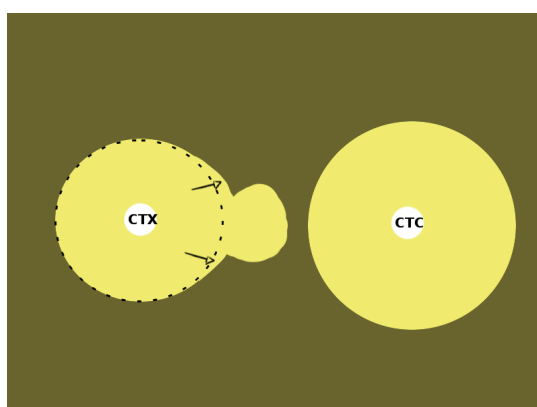
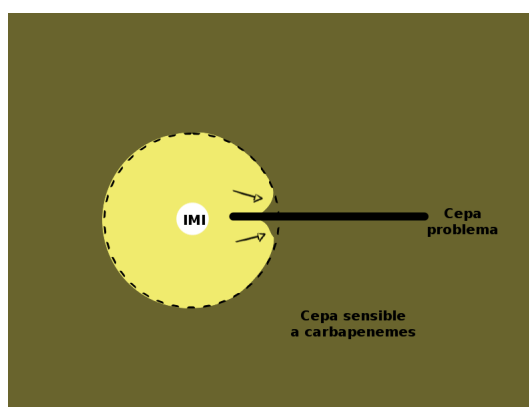
11.5. Detección de mecanismos de resistencia

Además de poder cuantificar la actividad de una determinada droga frente a un microorganismo, o categorizar al mismo como sensible o resistente, algunas veces es de interés conocer

el mecanismo particular de resistencia. Existe una gran variedad de metodologías posibles dependiendo del microorganismo, de la droga, del mecanismo de resistencia y de la precisión con la que se necesite la información. A continuación veremos algunos ejemplos.

11.5.1. Métodos fenotípicos de detección

1. Detección rápida de carbapenemasas mediante la técnica de Blue-Carba.
Se suspende una ansada de la cepa problema en un tubo Eppendorf conteniendo una solución de imipenem, SO_4Zn y azul de bromotimol. Cuando la cepa en cuestión es productora de carbapenemasa, luego de una incubación de 2 hs se produce la hidrólisis del imipenem y una consecuente modificación del pH. La reacción se pondrá de manifiesto por el viraje del indicador desde el azul al amarillo. Se realizan controles positivos y negativos en paralelo.
La detección de betalactamasas mediante la utilización de sustratos cromogénicos de la enzima es otro ejemplo de método rápido de detección fenotípica.
2. Detección de BLEEs
Las betalactamasas de espectro extendido tienen la particularidad de ser inhibidas por inhibidores de betalactamasas. Si se comparan los diámetros de los halos de inhibición de un disco de una cefalosporina de tercera generación, con otro disco donde la misma cefalosporina está combinada con un inhibidor, veremos una diferencia de por lo menos 4 o 5 mm en caso de un microorganismo portador de BLEE. De la misma manera, si colocamos ambos discos próximos entre sí, se puede observar un aumento de la zona de inhibición de la cefalosporina en las proximidades del disco con inhibidor. Este fenotipo recibe por su forma los nombres de “huevo” o “corcho”. Ver Figura 11.5.1 b.
Otro ejemplo de mecanismo que se manifiesta mediante la formación de un “huevo”, son las carbapenemasas inhibibles por EDTA
3. Búsqueda de carbapenemasas mediante el bioensayo de Masuda.
En este método se inocula un medio agarizado con una cepa sensible a los carbapenemes. Sobre la siembra se deposita un disco de papel impregnado de algún carbapenem (por ej: imipenem). Luego con un ansa se realizan estrías de los microorganismos a estudiar. En el caso de que el microorganismo posea alguna carbapenemasa, provoca una deformación en el halo de inhibición de la cepa sensible, ya que la enzima presente en las proximidades de la estría hidroliza al carbapenem. Ver Figura 11.5.1 c.
Este biosensayo y otros similares pueden ser adaptados para la búsqueda de otras enzimas mediante la modificación de los discos de antibióticos usados y la cepa sensible utilizada como indicador.
4. D-test para detección de resistencia inducible a clindamicina mediada por la enzima metilasa (gen *erm*)
Se siembra una placa de Petri con el microorganismo en estudio (cocos Gram-positivos). Se coloca un disco de papel impregnado con clindamicina la cual es afectada por el mecanismo de resistencia, pero no es buena inductora del mismo, por ende muestra un fenotipo sensible. A 2 cm de distancia se coloca otro disco con eritromicina, que además de ser afectada por el mecanismo de resistencia, sí es buena inductora. Luego de la incubación, en la zona de siembra ubicada entre ambos discos, el mecanismo de resistencia se encuentra inducido por la eritromicina, y en consecuencia se produce una reducción del diámetro de inhibición de clindamicina. Ver Figura 11.5.1 a.
Esta misma metodología se utiliza para detectar betalactamasas de tipo AMP-c.

Figura 11.5.1: Detección de mecanismos de resistencia.**(a)** D-test. CLI: clindamicina. ERI: eritromicina**(b)** Detección de BLEEs. CTX: cefotaxima. CTC: cefotaxima-clavulánico.**(c)** Bioensayo de Masuda. IMI: imipenem

11.5.2. Métodos genotípicos de detección

Los métodos moleculares son una herramienta importante que contribuye al diagnóstico rápido y efectivo de cepas resistentes que colonizan un paciente. Si bien su uso de rutina no está indicado, se utilizan principalmente para monitorear la resistencia a antibióticos con fines epidemiológicos. Por ejemplo, estos métodos han sido fundamentales para entender los mecanismos de resistencia a meticilina en *S. aureus* (MRSA), lo cual permitió modificar las técnicas de detección usadas en el laboratorio, y también han ayudado a documentar la diseminación de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) en diferentes poblaciones. Actualmente existen métodos que detectan resistencia a rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*, esto tiene gran importancia clínica, ya que las cepas de este microorganismo son generalmente multiresistentes.

La detección molecular de determinantes de resistencia microbiana suele representar un gran desafío, principalmente por la complejidad genética de la resistencia a antibióticos. La emergencia de resistencia no sólo puede deberse a la adquisición de nuevos genes, sino que también puede ser el reflejo de cambios en la expresión génica o la ocurrencia de mutaciones. Además, la detección de genes de resistencia no necesariamente significa que sean expresados o funcionales. Por otro lado, la capacidad de detección de los métodos genéticos es francamente superior a la de los métodos fenotípicos en situaciones en las cuales la expresión del mecanismo es muy débil en condiciones in vitro.

11.6. Parte Práctica

11.6.1. Objetivo

- Comprender distintos métodos fenotípicos y genotípicos de detección de mecanismos de resistencia.

11.6.2. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia

Método rápido para la detección de carbapenemasas (Blue - Carba)

Se utilizará la técnica de Blue- Carba modificada por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, para detectar la presencia de carbapenemasa en una cepa de enterobacteria.

Solución A

Azul de bromotimol	40 mg
SO ₄ Zn.....	1,6 mg
H ₂ O	100 ml
Ajustar a pH 7,0	

Técnica

1. Por cada cepa a ensayar utilice 2 tubos Eppendorf.
 - Tubo control: 100 µl de Solución A
 - Tubo prueba: 100 µl de Solución A + imipenem (3mg/ml)
2. Suspender en cada tubo una ansada de la cepa a probar.
3. Repetir los pasos 1 y 2 para con una cepa sensible (control negativo) y con una cepa en la cual ya se ha determinado la producción de carbapenemasa (control positivo).
4. Tapar los tubos e incubar no más de 2 hs a 35-37 °C, en agitación.

Interpretación

Tubo control	Tubo prueba	Resultado
Azul	Amarillo	Carbapenemasa positivo
	Verde	Carbapenemasa positivo
	Azul	Carbapenemasa negativo
Verde	Amarillo	Carbapenemasa positivo
	Verde	Carbapenemasa negativo
Amarillo	Azul, verde o amarillo	Test inválido

Otros métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia

Se observarán durante la jornada de trabajo práctico distintas placas con métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia (AMP-c, BLEEs, carbapenemasas, etc) que serán analizados y discutidos grupalmente.

11.6.3. Detección genotípica de mecanismos de resistencia

Se realizará la detección de resistencia a claritromicina (macrólido) por técnicas moleculares en cepas de *H. pylori*. Este microorganismo es un bacilo Gram-negativo que coloniza la mucosa gástrica de aproximadamente la mitad de la población humana mundial y establece una infección crónica que va desde gastritis crónica, úlceras pépticas hasta poder generar cáncer gástrico. La resistencia a los antimicrobianos de elección (claritromicina y metronidazol) ha aumentado a nivel mundial provocando fallas en el tratamiento de erradicación lo que constituye un problema en Salud Pública por las patologías a las que está asociado el microorganismo.

Claritromicina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse directamente al ARN ribosomal (ARN r) 23S de la subunidad mayor del ribosoma. El mecanismo de resistencia a macrólidos en *H. pylori* se debe a una disminución de la fijación del antibiótico a los ribosomas debido a una mutación puntual situada en los genes del ARN ribosómico en posición 2143 y 2142. Una adenina que normalmente está presente es reemplazada por una guanina (en 2143 o 2142) o una citosina (2143).

Extracción de ADN

Técnica

Modificación de Z Ge and Taylor DE. HP Protocols´book.

1. Resuspender las células de media caja de cultivo con buen desarrollo de *H. pylori* en 200 µl de buffer (0.15 M ClNa, 0.1 M EDTA pH 8). Mezclar con tips amarillos. (Figura 11.6.1)
2. Adicionar 20 µl SDS (20 % p / v), mezclar cuidadosamente hasta que quede clara.
3. Adicionar 500 µl de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con vortex.
4. Centrifugar 15 min. a máxima revolución.
5. Remover la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf.
6. Preparar tubos con 50 µl de agua destilada estéril.
7. Adicionar 700 µl de etanol frío (95 °C conservado a -20 °C). Ovillar el ADN precipitado y transferirlo al tubo con agua. Tomar tanta cantidad como sea posible.
8. El ADN está listo para usar. Es aconsejable realizar una dilución 1:100 para PCR.

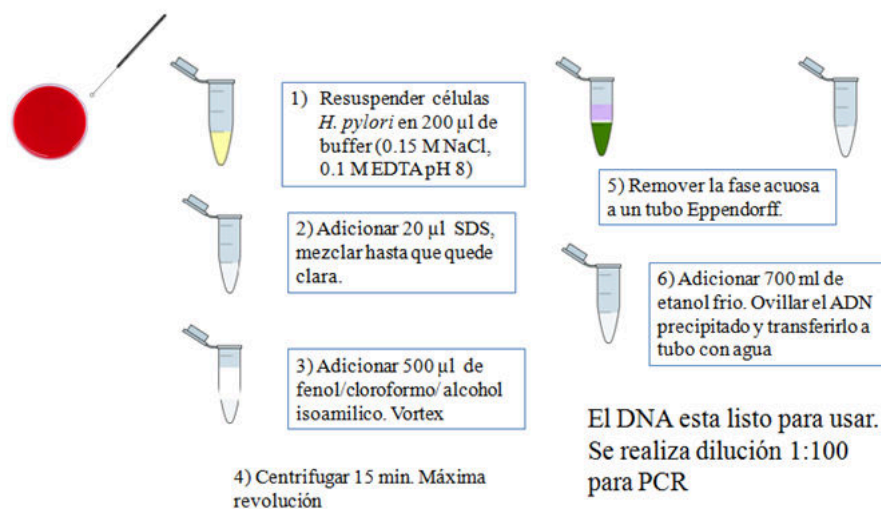
Importante:

En el paso 5, si la solución no está clara, se puede lavar nuevamente con cloroformo pero normalmente no es necesario. Si la cantidad de líquido es menos de 50 µl, se podría adicionar buffer de extracción y repetir hasta conseguir aproximadamente 200 µl.

En el paso 7, si el ADN no ha precipitado, se puede centrifugar 15 min., evaporar el alcohol y resuspender en 50 µl de agua.

Reactivos Extracción ADN:

- Buffer de extracción 0.15 M ClNa, 0.1 M EDTA pH 8.
- Dodecil Sulfato de Sodio SDS (20 % p / v).
- Fenol equilibrado.
- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.
- Etanol 95 °C.
- Agua destilada estéril o agua de alta calidad.

Figura 11.6.1: Técnica de extracción de ADN a partir de cultivos de *H. pylori*.

Amplificación (PCR)

Una vez obtenido el ADN cromosomal de *H. pylori*, se realiza una PCR para la amplificación específica del fragmento de 425 pb correspondiente al gen 23S.

Preparación de la mezcla de ensayo (Master MIX)

	Concentración	1 Muestra
Buffer	1X	5 μ l
Mg ²⁺	2,5 mM	2,5 μ l
dNTPs	0,2 mM	5 μ l
Primer Hp23F	1 M	5 μ l
Primer Hp23R	1 M	5 μ l
Taq	1 U	0,2 μ l
H ₂ O ultrapura		22,3 μ l
ADN		5 μ l
Total		50 μ l

Volumen final: 50 μ l

Distribuir 5 μ l del ADN en tubos Eppendorf para PCR.

Adicionar 45 μ l de la Mix.

Programa de amplificación

	Desnaturalización inicial	94 °C - 10 min
39 ciclos	Desnaturalización	94 °C - 1 min
	Hibridación	55 °C - 1 min
	Extensión	72 °C - 1 min
	Extensión final	72 °C - 10 min

Detección de resistencia a claritromicina por RFLP

Para detectar las mutaciones puntuales debidas al reemplazo de una adenina por una guanina en las posiciones 2142 y 2143 del gen 23s ARN r, el producto amplificado en la reacción de PCR anterior se somete a cortes con enzimas de restricción:

- *MbolI*: A2142G (Amersham Biosciences Argentina, SA)
- *BsaI*: A2143G (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

Técnica

	1 Muestra
H ₂ O ultrapura	7,5 µl
Amplificación gen 23S rRNA	10 µl
Buffer de enzima (I ó II)	2 µl
Enzima (I ó II)	0,5 µl
Total	20 µl

Dejar toda la noche a temperatura correspondiente para el corte con la enzima:

- *MbolI*: 37 °C
- *BsaI*: 50 °C

Revelar mediante corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.8 % hidratado con buffer TBE 1X.

Corrida electroforética

Preparar un gel de agarosa al 1.8 % en buffer de corrida TBE.

Adicionar 1 µl Gel red (concentración madre 5 mg / ml)

Sembrar en cada pocillo, 10- 12 µl de las muestras amplificadas.

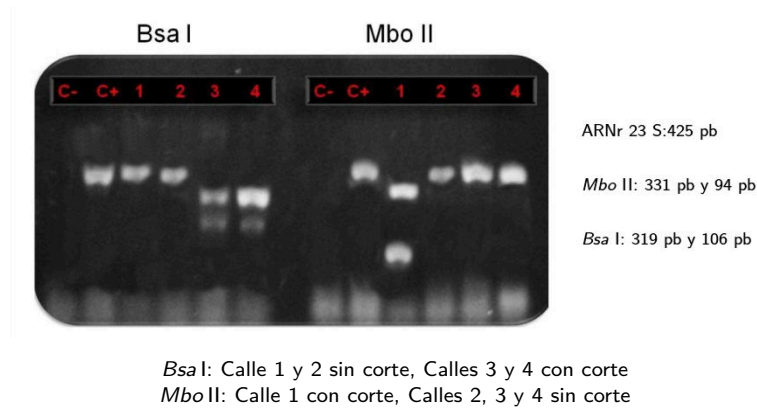
Someter a una corrida electroforética con voltaje constante (80 volts) durante 45 min.

Observar en transiluminador los fragmentos correspondientes a los cortes (Figura 11.6.2).

- Muestras 1, 3 y 4 presentan mutación (corte con alguna de las 2 enzimas) por lo cual son resistentes.
- Muestra 2 no presenta mutación (no se detecta corte con alguna de las 2 enzimas) por lo cual es sensible.

11.7. Bibliografía

- Brock. Biología de los Microorganismos. 12ª Edición. Michael T. Madigan y col. 2009.
- Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. 1ª Edición. Lancini G., Parenti F., Gallo G.G. 1995.
- Tortora. Microbiology and introduction. 11ª Edición. Gerard J. Tortora y col. 2013.
- Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. 7ª Edición. Joanne M. Willey y col. 2008.
- Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection. Preservation and Sterilization. 4ª Edición. Russell y col. 2004.

Figura 11.6.2: Corrida electroforética.

Lodish, Harvey y col. Biología celular y molecular. 5 ed. 2005

Jorgensen, James. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC, 11th edition, 2015.

Pasteran, Fernando y col. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol (2015). 53:1996–1998.

Di Conza, JA y Gutkind, GO. Integrones: los coleccionistas de genes. Revista Argentina de Microbiología (2010) 42: 63-78

12 Productos inmunológicos.

12.1. Vacunas

Una vacuna, según la definición tradicional, es un producto formado por un microorganismo completo atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente a dicho microorganismo virulento. La finalidad de las vacunas es la de prevenir y controlar futuras infecciones.

El punto clave de la fabricación de una vacuna lo constituye la habilidad de poder preparar desde un patógeno un **inmunógeno seguro** que provoca protección para una enfermedad determinada.

12.1.1. Según Farmacopea Argentina VIII edición: Vacunas para uso humano

Las vacunas para uso humano son preparaciones que contienen sustancias antigénicas capaces de inducir en el hombre una inmunidad activa específica contra un agente infeccioso o toxina o antígeno elaborada por el mismo. Las vacunas deben poseer una actividad inmunogénica aceptable demostrada para el esquema propuesto.

La vacunas para uso humano pueden contener: organismos inactivados por medios químicos o físicos que mantengan las propiedades inmunogénicas adecuadas; organismos vivos que son naturalmente no virulentos o que han sido tratados para atenuar su virulencia conservando las propiedades inmunogénicas adecuadas; antígenos extraídos o secretados de organismos o producidos por ingeniería genética. Los antígenos pueden ser utilizados en su estado nativo o detoxificado por medios físicos o químicos y pueden ser agregados, polimerizados o conjugados a un portador para incrementar su inmunogenicidad.

12.1.2. Clasificación

Vacunas clásicas

Vacunas a gérmenes muertos: Se trata de suspensiones de bacterias o virus intactos, los cuales han sido tratados con diversos agentes físicos o químicos de tal manera que aunque los microorganismos estén muertos, aún pueden inducir la respuesta de **anticuerpos**.

Como ejemplos podemos mencionar:

1. Vacuna convencional contra la tos convulsa
2. Vacuna tifoidea
3. Vacuna contra el cólera
4. Vacuna Salk contra la poliomielitis

Vacunas a gérmenes vivos: Son suspensiones de bacterias o virus vivos, los cuales son **inmunogénicos** pero no **patogénicos**.

Ejemplos:

1. Vacuna contra la viruela
2. Vacuna BCG (Bacillus de Calmette y Guérin) no patógena debido a sucesivos pasajes en medios de papa biliada y glicerizada.
3. Vacuna Ty21a, nueva vacuna contra la fiebre tifoidea.
4. Vacuna contra el cólera (Texas Star), avirulenta por tratamiento de la bacteria con el mutágeno nitroguanidina, que afecta a diversas enzimas, volviéndola avirulenta.
5. Vacuna virales contra:
 - a) Fiebre amarilla
 - b) Poliomielitis
 - c) Rubeola
 - d) Sarampión
 - e) Paperas

Vacunas de subunidades 1. Toxoides o anatoxinas (Tos ferina).

2. Fracciones virales (Gripe).
3. Fracciones bacterianas (Tos ferina).
4. Polisacáridos capsulares: (Neumonía y meningitis).
5. Polisacáridos capsulares conjugados con proteínas (Enfermedad neumocócica, meningocócica, H. influenzae tipo b.)

Nuevas vacunas

Vacunas atenuadas mediante manipulación genética: Obtenida mediante transferencia de DNA bacteriano o viral a especies bacterianas o levaduras para que se produzcan en ellas inmunógenos en huéspedes no naturales.

Vacunas de péptidos sintéticos: Copia de la secuencia aminoacídica de las proteínas antigénicas procedentes de patógenos. Ejemplo: Malaria.

Vacunas anti-idiotipo: Anticuerpos que reproducen la morfología del antígeno, induciendo inmunidad. Ejemplo: Malaria, Vacuna para cáncer de pulmón (Vaxira).

Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes: Producción de grandes cantidades de la proteína por medio de la inserción de ADN en sistemas de expresión (bacterias y plantas).

- Expresión en bacterias: Ejemplo: Hepatitis B.

Vacunas génicas: Administración de material genético procedente del patógeno.

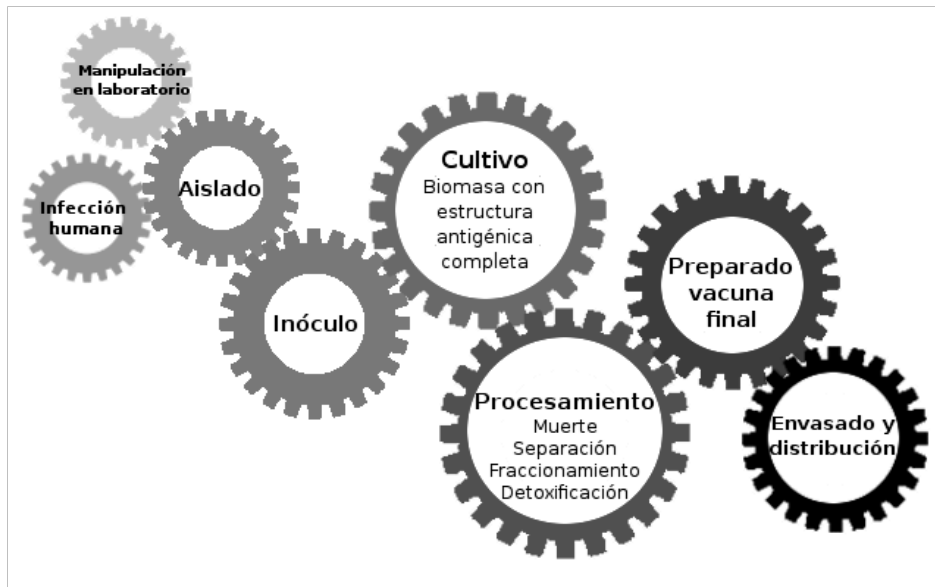
1. Vectores víricos y bacterianos vivos (en desarrollo).
2. Vacunas de ADN desnudo (en desarrollo).

Vacunas comestibles: Producción de proteínas antigénicas en plantas comestibles (en desarrollo).

12.1.3. Producción de vacunas

La producción de vacunas comprende diferentes etapas:

1. Obtención del aislado y preparación del inóculo.
2. Cultivo.
3. Procesamiento.
4. Preparado final la vacuna.
5. Envasado y distribución.



Obtención del aislado y preparación del inóculo.

Primero se debe disponer de un aislado del microorganismo adecuado. Generalmente se parte de agentes patógenos aislados de infecciones humanas y/o veterinarias. En algunos casos las cepas adecuadas para la producción de la vacuna se consiguen rápidamente, en cambio en otros casos se ha requerido un considerable trabajo de manipulación y selección antes de alcanzar una cepa adecuada.

Luego de alcanzar el objetivo, se produce un **cultivo mediano** a partir de un **único** organismo, el cual es distribuido en pequeñas cantidades en un gran número de ampollas que son conservadas congeladas a -70°C o liofilizadas y que constituyen los inóculos (*lote semilla maestro*). Posteriormente se toman una o más ampollas y se producen con ellas un número limitado de cultivos para producir **vacunas de prueba**, las mismas son luego sometidas a pruebas de **seguridad y eficacia**, mediante ensayos clínicos. Si dan resultados satisfactorios se convalida todo el lote de inóculos, los cuales pueden ser luego usados para la producción de la vacuna.

Cultivo

Las condiciones óptimas de cultivo son críticas para el crecimiento satisfactorio de la biomasa bacteriana necesaria para la preparación de la vacuna. Es imprescindible que la biomasa bacteriana posea una estructura antigénica completa.

Se prefieren los medios líquidos a los sólidos y en el caso de medios líquidos utilizando grandes fermentadores y utilizando, donde sea posible, medios de cultivo de composición conocida, o aproximadamente conocida como los digeridos de caseína (N-Z case) para reducir las variaciones al mínimo con cada lote de vacuna producida. El cultivo se inicia tomando una ampolla con el inóculo (*lote semilla de trabajo* derivado del *lote semilla maestro*) y sembrándola en un **medio de preproducción**. Pueden hacerse uno o más pasajes.

Luego el desarrollo es utilizado para inocular el **medio de producción**, el cual se puede hacer en un gran número de pequeños recipientes o en un fermentador único grande. Cuando el crecimiento se hace en fermentador es convenientemente controlado y regulado. Se monitorea el pH y el potencial redox, los cuales son ajustados durante el período de crecimiento. En algunos casos este período es de pocas horas (24 a 48 hs), sin embargo puede durar hasta 2 semanas.

Luego del período de crecimiento, los cultivos hechos en pequeños recipientes son recolectados.



Procesamiento

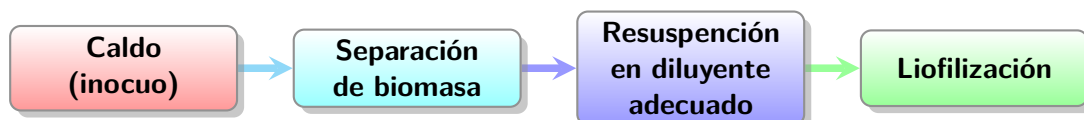
El caldo de cultivo obtenido es una mezcla compleja de:

- Células bacterianas
- Productos metabólicos
- Medio agotado

El procesamiento va a depender de que vacuna se trate.

- Vacunas a gérmenes vivos

En este caso el caldo es **inocuo** y todo lo que se necesita efectuar es la separación de la biomasa bacteriana y la resuspensión en un diluyente adecuado seguido de liofilización.



■ Vacunas a gérmenes muertos

El caldo obtenido a partir de un patógeno es sumamente peligroso y se deben efectuar cuidadosamente los siguientes pasos:

Si la vacuna se obtiene a partir de la biomasa de células se efectúa:

■ Muerte

Se emplea calor y el uso de desinfectantes.

Microorganismo	Agente usado
<i>Bordetella pertussis</i>	Calor + formol
<i>Vibrio cholerae</i>	Fenol
<i>Salmonella typhi</i>	Fenol o acetona (en caso de preparar la vacuna tifoidea seca)

■ Separación de la biomasa

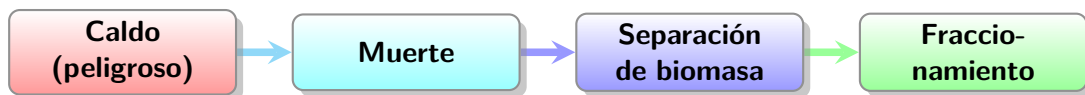
Implica los procesos para separar las células bacterianas del caldo. Se usa la centrifugación continua o discontinua, también es una alternativa precipitar las células por disminución del pH.

- En el caso de vacunas preparadas desde las células, se descarta el líquido y las células son resuspendidas en una solución salina.

■ Fraccionamiento

Se da en el caso de preparar vacunas con componentes de la célula bacteriana y consiste en la obtención de los componentes celulares en forma **purificada** mediante el uso de diversos procesos de extracción con solventes.

Bacteria	Solventes
<i>N. meningitidis</i>	Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
<i>S. pneumoniae</i>	Etanol

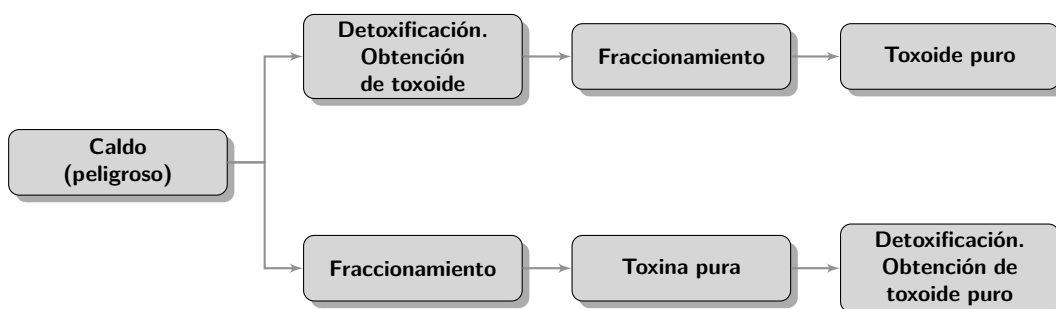


■ Vacunas de subunidades

Al estar preparadas desde un constituyente del caldo, como es el caso de toxinas exocelulares, son las células las descartadas, y se debe efectuar la detoxificación del caldo.

■ Detoxificación

Es el proceso mediante el cual las toxinas bacterianas exocelulares (presentes en el caldo) son convertidas en toxoides inofensivos. La formalina es utilizada para detoxificar las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*. La detoxificación puede hacerse ya sea en el caldo total en el fermentador, o en la toxina pura luego del fraccionamiento.



12.1.4. Producción de vacunas virales

Debido a que los virus sólo se replican en células vivas, las primeras vacunas virales se hicieron en animales (espinas dorsales en conejos, cerebro de ratón, en algunos casos se sigue usando para producción de la vacuna rábica). Sin embargo actualmente se utilizan **cultivos celulares**. La única excepción son las vacunas obtenidas en cultivos de embrión de pollo.

Crecimiento de los virus

- Embrión de pollo

El embrión de pollo es aún el más conveniente huésped para los virus necesarios para la preparación de dos importantes vacunas virales:

- Vacuna contra la gripe: Los virus de la influenza se acumulan en alto título en el **líquido alantoideo** del huevo infectado
- Vacuna contra la fiebre amarilla: Se acumulan en los **tejidos nerviosos del embrión**.

- Cultivos celulares

Normalmente los cultivos celulares son desarrollados como cultivos en monocapa en las paredes de recipientes de vidrio, aunque se han desarrollado también métodos más complejos utilizando: perlas de vidrio y un sistema de placas múltiples.

Los cultivos celulares principalmente utilizados para la obtención de vacunas virales son obtenidos desde células de:

- Riñón de mono
- Embriones de pollo
- Células diploides humanas (actualmente estos son los más utilizados)

Procesamiento del material viral

El procesamiento dependerá de donde proviene el cultivo.

- Embrión de pollo

En este caso el procesamiento puede tomar distintas formas:

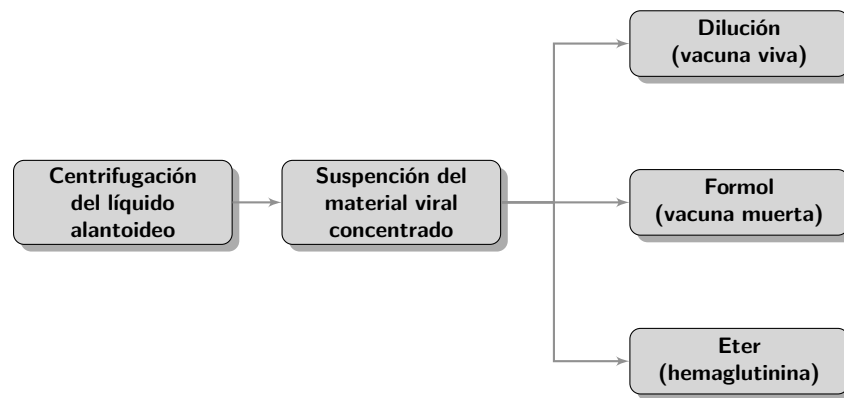
- Vacuna gripal

Se centrifuga el líquido alantoideo y se obtiene una suspensión purificada y concentrada de virus.

Si se quiere obtener una **vacuna viva** la suspensión anterior es convenientemente diluída.

Si se desea obtener una **vacuna muerta**, se trata la suspensión con formol.

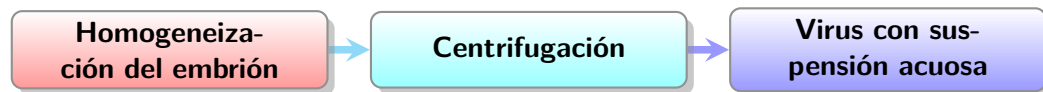
Si se desea obtener la vacuna desde la **hemaglutinina** se trata la suspensión con éter.



- Vacuna contra la fiebre amarilla

Los embriones de pollo para producir esta vacuna son tratados en forma diferente. Los mismos son homogeneizados en agua para obtener un puré que contiene el virus.

Luego se hace una centrifugación que precipita el residuo del embrión y deja la mayor parte del virus en suspensión acuosa.



- Cultivos celulares

En ellos se obtienen fluidos infectados que contiene poco residuo y pueden ser satisfactoriamente clarificados por filtración.

Ya que la mayoría de las vacunas virales consisten en **virus vivos atenuados**, no hay etapa de inactivación en su manufactura.

Sin embargo hay dos importantes excepciones:

- La vacuna de la poliomielitis a virus inactivos con β -propionolactona o formalina diluida.
- La vacuna rábica en donde el virus de la rabia es inactivado por β -propionolactona.

La preparación de estas vacunas inactivadas también incluye una etapa de concentración mediante **adsorción** y **elución** del virus en el caso de la vacuna de la poliomielitis y por **ultrafiltración** en el caso de la vacuna contra el virus rábico.

Cuando el procesamiento ha sido completado el material se conserva hasta su uso para el preparado de la vacuna final. Debido a la labilidad de muchos virus, es necesario conservar los productos purificados a -70°C .

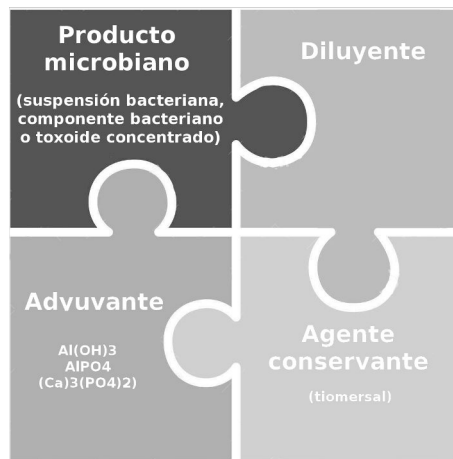
12.1.5. Preparado de la vacuna final (bacterianas y virales).

El preparado de la vacuna final es el proceso por el cual los distintos componentes de la vacuna son mezclados para obtener la vacuna final para su uso. Se realiza en un gran recipiente cerrado, provisto de agitación y de distintas entradas para la adición aséptica de los ingredientes de la vacuna y la retirada del producto final.

Las vacunas pueden ser adsorbidas en soportes inertes tales como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, etc. Además se utilizan conservantes antimicrobianos para prevenir el deterioro o efectos adversos causados por contaminación microbiana durante el uso de la vacuna. Usualmente se usa como conservante el tiomersal en las preparaciones

multidosis. Sin embargo, no se incluyen conservantes en los productos liofilizados y en las preparaciones líquidas monodosis.

Cuando se preparan las vacunas **bacterianas** usualmente las mismas necesitan ser diluidas en gran extensión. Por lo tanto primero se adiciona el diluyente al recipiente que generalmente contiene un agente conservante como el **tiomersal**, y en caso requerido se adiciona un adyuvante como el **hidróxido de aluminio**. Luego si se trata de una **vacuna única**, se agrega la suspensión bacteriana, o el componente bacteriano, o el toxoide concentrado, en una concentración tal que sea adecuada para obtener la concentración final requerida. Cuando se prepara una **vacuna combinada**, se adiciona cada componente requerido en una secuencia determinada.



Componentes de las mezclas bacterianas diluidas

En cambio cuando se preparan **vacunas virales**, como se necesita mantener una adecuada antigenicidad o infectividad, los fluidos del cultivo de tejidos o concentrados de ellos, son utilizados generalmente **sin diluir**. O en el caso de una **vacuna multicomponente**, simplemente se diluyen unos con otros.

Luego del mezclado, la vacuna final es fraccionada en volúmenes pequeños para facilitar su manejo.

12.1.6. Vacunas combinadas

Además de las vacunas únicas, están las **vacunas combinadas** que se preparan mezclando unos con otros los mismos concentrados usados para la preparación de las vacunas unicomponentes. Estas preparaciones mixtas inducen inmunidad a dos o más enfermedades simultáneamente y son tan convenientes como usadas individualmente. Por ejemplo difteria y tétanos. La más conocida es la **vacuna triple**: difteria-tétanos-pertusis (**DPT/vac**), compuesta por células enteras de *B. pertussis*, toxoide diftérico y el toxoide tetánico. Otras vacunas son: la vacuna difteria-tétano (**DT/vac**), la vacuna pentavalente y la cuádruple.

Las vacunas preparadas **sin adyuvante** son descriptas como **vacunas simples** y en el caso de toxoides como **vacunas fluidas**.

En cambio las preparadas **con adyuvantes** se describen como **vacunas adsorbidas**. El gel de **hidróxido de aluminio** es el adyuvante más común y es utilizado en la preparación de:

- Vacuna contra la difteria adsorbida
- Vacuna contra el tétano adsorbida
- Vacuna pertussis adsorbida
- Varias vacunas combinadas adsorbidas (vacuna triple adsorbida)

El **fosfato de aluminio** es una alternativa satisfactoria y en algunos países se prefiere el **fosfato de calcio**.

Usualmente se adiciona un conservante como el **tiomersal** siempre que se trate de vacunas inactivas que contiene mercurio, el cual reduce la posibilidad de contaminación durante el manejo de la vacunas, especialmente en el caso de las vacunas multidosis (aquellas contenidas en un único envase).

En el caso de vacunas virales, es inusual la obtención de preparaciones mixtas. Sin embargo debemos tener presente que tanto la vacuna contra la poliomielitis inactivada y oral, y la vacuna contra el virus influenza por virus muertos son mezclas de virus de varios **serotipos**. Además, el uso de adyuvantes en vacunas virales es limitado y su presencia es ventajosa solamente en vacunas hechas de virus inactivados. Las vacunas virales vivas atenuadas pierden potencia rápidamente en suspensión, para disminuir este problema estas vacunas son conservadas congeladas o se les puede agregar un agente estabilizador. Por ejemplo la vacuna contra la poliomielitis viva atenuada, se estabiliza efectivamente con el agregado de MgCl₂ o sacarosa.

12.1.7. Envasado y distribución

El preparado final de la vacuna es luego fraccionado en volúmenes pequeños y envasado en ampollas de dosis única o multidosis, pudiendo distribuirse en estado líquido o sólido. Si son dispensadas en **forma líquida** son selladas en sus recipientes, en cambio las dispensadas en **forma seca** son liofilizadas antes de sellarlas.

Las vacunas de administración por vía no parenteral son envasadas en recipientes estériles de cierre inviolable, las de administración parenteral deben además, liofilizarse.

12.1.8. Control de calidad

El control de calidad tiene dos objetivos básicos, probar tanto la eficacia (potencia) como la seguridad de cada producto producido. Debe ser efectuado para cada lote de vacuna.

Los resultados de estas pruebas son registrados en **protocolos especiales** con gran detalle, ya que en los países en donde la preparación de vacunas es regulada por ley, estos registros son analizados por las autoridades de control para juzgar si cada lote de vacuna producida es adecuada o no.

También este control debe ser practicado con las vacunas importadas.

El control de calidad incluye:

- Control del proceso de producción de la vacuna
- Control del producto final

Se efectúa en relación a lo establecido por la Farmacopea e incluye a cuatro ensayos:

- **Test de identidad**
Mediante este test se corrobora que el material contenido en una ampolla corresponda a la leyenda del rótulo. Se efectúa por métodos de **aglutinación** y **precipitación** “in vitro” en el caso de vacunas bacterianas y en el caso de vacunas virales virus vivos por **neutralización** de los efectos citopatogénicos usando antisueros específicos.
- **Ensayo de potencia**
En este ensayo se debería hacer un ensayo clínico en humanos, pero como esto es éticamente poco probable, se hacen pruebas de laboratorio. Las mismas incluyen:
 - Técnicas fisicoquímicas y serológicas.
 - Métodos biológicos por test en animales de experimentación.
En este caso se evalúa la capacidad de la vacuna para estimular la formación de **anticuerpos** en comparación con una vacuna “standard”. Se efectúa el denominado **análisis de cuantificación 3 + 3**, en el cual tres diluciones en serie de la vacuna a chequear se **comparan** con tres diluciones en serie de vacuna standard en su capacidad de estimular la formación de anticuerpos en animales de laboratorio (ratones y cobayos) efectuándose luego el desafío con el patógeno o toxina.
 - Para vacunas conteniendo organismos vivos, el ensayo de **potencia** se efectúa por métodos de **recuento en placa** (para el caso de la vacuna BCG) o en el caso de vacunas virales por inoculación en cerebro de ratones o utilizando cultivos celulares en monocapa en cajas de Petri.
- **Test de seguridad**
Debido al hecho de que muchas vacunas son preparadas utilizando materiales de partida sumamente tóxicos, este test es de vital importancia. Estos tests están especificados en la Farmacopea.
Se pueden describir cuatro tipos principales:
 - En vacunas conteniendo gérmenes muertos se inoculan medios de cultivo debiéndose comprobar ausencia de desarrollo.
 - Los toxoides (diftérico y tetánico) se comprueban por inoculación a cobayos, los cuales son altamente sensibles.
 - En vacunas virales muertas inactivadas se prueba la falta de efectos en cultivos celulares o en animales susceptibles.
Con vacunas virales inactivadas es de suma importancia este test por ejemplo en la vacuna contra la poliomielitis inactivada (vacuna Salk), el cual se hace por inoculación intraespinal en monos.
 - Con vacunas virales atenuadas vivas el riesgo mayor es la **reversión** a un grado de virulencia capaz de producir enfermedad en el vacunado. Para la vacuna contra la poliomielitis atenuada (vacuna Sabin oral) este test se efectúa por inoculación intraespinal en monos, comparando los resultados de neurovirulencia contra una vacuna patrón de referencia.
- **Test de aplicación general**
Los mismos incluyen:
 - Esterilidad
A excepción de la vacuna de la viruela hecha desde dermis y la vacuna BCG,

todas las vacunas deben ser bacteriológicamente y micológicamente estériles. El método preferido para chequear esterilidad es por filtración, puesto que esta técnica permite chequear grandes volúmenes sin que se produzca dilución. Se investiga la presencia de microorganismos aerobios, anaerobios y hongos.

- Producto libre de toxicidad anormal
Para descartar la existencia en el producto de cualquier contaminante altamente tóxico, se inoculan 5 ratones y 2 cobayos con una dosis única de vacuna y deben sobrevivir a los 7 días sin presentar ningún signo de enfermedad.
- Presencia de Aluminio y Calcio
La cantidad de aluminio, ya sea como hidróxido o como fosfato, no debe ser mayor de 1,25 mg por dosis y se determina complexométricamente. La cantidad de fosfato de calcio no debe ser mayor de 1,3 mg por dosis.
- Concentración de formol libre
La concentración no debe exceder 0,02‰ y se estima mediante reacción de color con acetilacetona.
- Concentración de fenol
La concentración de fenol no debe exceder 0,5 % cuando se usa como agente conservante en la vacuna tifoidea o vacuna del cólera.

12.2. Inmunosueros

Los inmunosueros suministran anticuerpos ya formados para la prevención de enfermedades en contactos excepcionales por ejemplo viajes al exterior y lo que es más importante, para el **tratamiento** de enfermedades establecidas.

Existen ocho clases de inmunosueros, sin embargo como las enfermedades más comunes (difteria y tétanos) han sido erradicadas en los países industrializados mediante la implementación de adecuados planes de vacunación y los seis inmunosueros restantes son para condiciones poco frecuentes, la producción de inmunosueros es en la actualidad menos importante que en el pasado.

Para la obtención de inmunosueros se utilizan caballos, ovejas, cabras. Los mismos son inmunizados por inyecciones repetidas del antígeno.

Inicialmente se utiliza el toxoide, pero cuando ya se ha formado algo de anticuerpo protector, se le inyecta toxina pura, la cual tiene un estímulo antigénico mayor.

Se investiga en sangre el título de anticuerpos y cuando el mismo es elevado, se efectúa el sangrado, volcando varios litros de sangre mediante punción venosa en una solución de citrato. Se separa el plasma, luego se diluye con agua, se digiere con pepsina y se fracciona con sulfato de amonio, en este paso se elimina albúmina.

El producto final denominado **inmunosuero refinado** se filtra, se diluye a la concentración adecuada y se envasa.

Control de calidad

La calidad del inmunosuero se controla por ensayos específicos de **potencia** y por las **pruebas de seguridad**.

En los ensayos de potencia se obtiene una estimación del contenido de antitoxina en UI/ml mediante comparación de la capacidad que tiene el inmunosuero y una correspondiente preparación standard calibrada en UI/ml, de neutralizar una dosis fija de la toxina homóloga.

El test de seguridad controla:

- Especie de origen
- pH
- Esterilidad
- Concentración de fenol
- Toxicidad anormal
- Contenido proteico total
- Presencia de albúmina contaminante

12.3. Inmunoglobulinas humanas

De igual manera que los inmunosueros, las inmunoglobulinas humanas suministran anticuerpos disponibles inmediatamente, pero al ser homólogas, ni sensibilizan ni causan reacciones en personas hipersensibles. Además un aspecto muy importante al ser **homólogas**, ellas son eliminadas de la sangre mucho más lentamente que los inmunosueros heterólogos, teniendo por esta causa un efecto más prolongado.

La fuente de la mayoría de las inmunoglobulinas humanas es **sangre humana** de donantes pero ocasionalmente es usada **sangre de placenta**.

Hay dos tipos de inmunoglobulinas, la normal y las específicas (por ejemplo para sarampión, tétano, virus de la vacuna).

Se hacen colecciones de plasma de no menos de 1000 donores para la preparación de una **inmunoglobulina normal** pero se acepta un número mucho menor para la preparación de **inmunoglobulinas específicas**, siendo éstas hechas necesariamente utilizando exclusivamente sangre de convalecientes o de vacunados recientes.

Para aumentar el rendimiento de los constituyentes útiles terapéuticamente obtenibles desde el plasma humano, es decir enriquecer la fracción de inmunoglobulina, se han empleado varios métodos. Se puede efectuar una precipitación fraccionada con etanol en frío, con riguroso control de pH y fuerza iónica y recientemente se ha introducido el uso de rivanol y sulfato de aluminio, tendientes a incrementar el rendimiento y facilitar la producción de inmunoglobulinas.

La fracción de inmunoglobulina obtenida se puede dispensar liofilizada o en solución salina a una concentración de 10 a 20 veces mayor a la del plasma natural.

Se puede agregar **glicina** como estabilizador y **tiomersal** como conservante.

Control de calidad

El control de calidad incluye también la determinación de la **potencia** mediante pruebas de **neutralización** de toxinas bacterianas o **infectividad** de virus.

Los test de seguridad controlan:

- pH
- Esterilidad
- Toxicidad anormal
- Contenido proteico total
- Estabilidad
- Pirogenicidad
- Origen humano (por test de precipitación)
- Homogeneidad (mediante electroforesis y por determinación de los coeficientes de sedimentación en ultracentrífuga).

12.4. Parte práctica

12.4.1. Objetivo

Realizar seminarios sobre las distintas vacunas disponibles en el mercado.

12.4.2. Modalidad del seminario

Los seminarios se expondrán individualmente o en grupos, debiendo emplear soporte multimedia (Power Point, Prezi, PDF). En las diapositivas se deberá reflejar el trabajo de comprensión y síntesis de la lectura realizada. La exposición deberá realizarse en un tiempo aproximado de 10 minutos.

12.4.3. Evaluación

Se evaluarán en forma oral los conceptos expuestos y además se deberá entregar a la cátedra el archivo multimedia en forma digital o impresa.

12.5. Bibliografía

Farmacopea Argentina VIII Edición Volumen III.(en revisión)

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. "Microbiology" An introduction. 2013. 11ªEd. Pearson Education Inc.

Hugo and Russell's. Pharmaceutical Microbiology. Ed. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP. 7ªEdition. 2004

Vacunas humanas de nueva generación. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM.2004