50 años Universidad Nacional de San Luis

FQBF

Guía de Trabajos Prácticos

MICROBIOLOGÍA GENERAL Y FARMACÉUTICA

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL

mde

MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

2025

ISSN 2545-7683

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía de Trabajos

MICROBIOLOGÍA GENERAL

Y FARMACÉUTICA

Autores:

Dr. Ángel G. SALINAS IBÁÑEZ

Mg. Verónica I. GÓMEZ

Farm. Mariana E. COZZOLINO

Mic. Hebe J. IRIARTE

Lic. Enzo N. LANDOLFO OLIVERA

FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2025

RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano
Dra. Sebastián ANDUJAR

Secretaria Académica
Dra. Mónica OLIVELLA

Comisión de la Serie Didáctica:
Material Didáctico para Estudiantes

Coordinadora
Dra. Yamina DÁVILA

Integrantes
Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

Dra. Verónica FILIPPA
Dra. Ethelina CARNELUTTI

Departamento de Farmacia

Dra. Cecilia PERALTA
Dra. Ana VICARIO

Departamento de Química

Dr. José A. BOMBASARO
Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA

Edición
Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión

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 estudio dirigidos y compresión 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 acordes 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.fqbf.unsl.edu.ar/mde.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.

Presentación del curso

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 estudiante 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 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 cumplimentan 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 de Higiene, Sanidad y Primeros Auxilios y Química Biológica.

Índice

1 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología 1
OBJETIVOS 1
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 1
1. Peligro, riesgo biológico y bioseguridad 1
2. Vías de exposición comunes 2
3. Factores que afectan el riesgo biológico 2
4. Evaluación de riesgos y normas de bioseguridad 3
4.1. Requisitos básicos 5
4.2. Equipos de protección personal 7
4.3. Medidas de control reforzadas 8
4.4. Medidas de máximas de contención 8
5. Cabinas de seguridad biológica 8
5.1. CSB de clase I 8
5.2. CSB de clase II 9
5.3. Cabina de clase III 9
6. Gestión de residuos en el laboratorio de Microbiología 10
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 10
BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA DE INTERÉS 11
2 Esterilización y medios de cultivo 12
OBJETIVOS 12
ESTERILIZACIÓN 12
1. Definición y aplicaciones 12
2. Clasificación de los métodos de esterilización 13
3. Esterilización por calor 13
3.1. Esterilización por calor húmedo-Autoclave Chamberland 13
3.2. Esterilización por calor seco 15
4. Filtración esterilizante de fluidos 16
4.1. Esterilización de líquidos 16
4.2. Esterilización de gases 18
5. Control del proceso de esterilización 18
5.1. Indicadores físicos 18
5.2. Indicadores químicos 18
5.3. Indicadores biológicos 19

MEDIOS DE CULTIVO **20**
1. Nutrición y cultivo de microorganismos 20
2. Requisitos nutricionales 20
2.1. Fuente de carbono 20
2.2. Fuente de nitrógeno 20
2.3. Fuente de hidrógeno y oxígeno 21
2.4. Fuente de azufre y fósforo 21
2.5. Metales 21
2.6. Factores de crecimiento 21
3. Componentes opcionales - Agentes solidificantes 21
4. Requisitos Energéticos 22
5. Factores ambientales 22
6. Clasificación de los medios de cultivo 23
BIBLIOGRAFÍA 25
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 26
3 Siembra, aislamiento y conservación de microorganismos **31**
OBJETIVOS 31
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 31
1. Crecimiento en cultivo. Conceptos de siembra, aislamiento y repique 31
2. Técnica aséptica para transferencia de microorganismos 32
2.1. Procedimiento general 32
2.2. Procedimientos específicos de inoculación 33
3. Aislamiento 35
4. Cultivo de bacterias anaerobias 35
4.1. Dispositivos de incubación anaerobia 35
4.2. Sistemas para generar anaerobiosis 36
5. Conservación de cultivos bacterianos 37
5.1. Subcultivos o transferencias periódicas en medio fresco 37
5.2. Suspensión en agua destilada 37
5.3. Crioconservación 38
5.4. Liofilización 39
BIBLIOGRAFÍA 40
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 40
4 Características culturales del crecimiento Identificación fenotípica **43**
OBJETIVOS 43
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 43

1. Características fenotípicas microbianas 43
1.1. Características culturales o macroscópicas 44
1.2. Características microscópicas 44
1.3. Pruebas bioquímicas 49
2. Aplicaciones de la identificación fenotípica 52
3. Manual Bergey-ABIS online 53
3.1. Sistemas comerciales multipruebas 53
3.2. Manuales 53
3.3. Automatizados 53
BIBLIOGRAFÍA 53
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 54
5 Identificación genotípica de microorganismos 56
OBJETIVOS 56
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 56
1. Información genética. ADN y ARN 56
2. Transmisión de la información genética: replicación del ADN 57
3. Síntesis de ARN y proteínas 57
4. Identificación genotípica de microorganismos 57
5. Secuenciación genómica 58
5.1. Secuenciación de ADN de primera generación. Método didesoxi de Sanger ... 58
5.2. Secuenciación de ADN de segunda generación (Illumina) 58
5.3. Secuenciación de ADN de tercera generación (nanotecnología) 59
5.4. Secuenciación de ADN de cuarta generación por nanoporos 59
6. Técnicas moleculares 59
6.1. Huella Dactilar de Plásmidos (PF) 59
6.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) 60
6.3. PCR en tiempo real (qPCR) 61
6.4. PCR transcriptasa reversa (RT-PCR y RT-qPCR: *Reverse Transcriptase*) 62
6.5. PCR de baja astringencia y un único cebador 63
BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA 65
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 65
6 Determinación cuantitativa del crecimiento microbiano 68
OBJETIVOS 68
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 68
1. Clasificación de los métodos cuantitativos de crecimiento microbiano 68
2. Recuento de células 69

2.1. Métodos directos ... 69
2.2. Métodos indirectos ... 72
3. Masa celular ... 75
3.1. Método directo-Determinación por peso seco ... 75
3.2. Método indirecto-Turbidimetría ... 76
4. Actividad celular ... 78
5. Recuento de partículas virales ... 78
5.1. Ensayos de formación de calvas o placas ... 78
5.2. Determinación de CCID50 ... 79
BIBLIOGRAFÍA ... 79
ACTIVIDADES A DESARROLLAR ... 79
7 Cinética del crecimiento microbiano ... 81
OBJETIVOS ... 81
INTRODUCCIÓN TEÓRICA ... 81
1. Sistemas de cultivos microbianos ... 81
1.1. Cultivo discontinuo ... 81
1.2. Cultivo continuo ... 86
1.3. Cultivo discontinuo alimentado ... 86
2. Crecimiento de levaduras ... 87
2.1. Metabolismo de las levaduras-Efecto Crabtree ... 87
2.2. Efecto Crabtree y velocidad de crecimiento de *S. cerevisiae* ... 88
2.3. Crecimiento diáuxico en *S. cerevisiae* ... 88
BIBLIOGRAFÍA ... 89
ACTIVIDADES A DESARROLLAR ... 89
PRÁCTICO DE AULA ... 93
8 Enfermedades infecciosas ... 94
OBJETIVOS ... 94
INTRODUCCIÓN TEÓRICA ... 94
1. Interacciones microbianas en humanos ... 94
2. Características de las enfermedades infecciosas ... 94
3. Períodos de la enfermedad infecciosa ... 95
4. Clasificaciones de enfermedades infecciosas ... 96
5. Postulados de Koch ... 97
6. Patogenicidad y Virulencia ... 99
6.1. Patógenos primarios versus patógenos oportunistas ... 100
6.2. Etapas de la patogenia ... 101

BIBLIOGRAFÍA 104
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 105
9 Evaluación de la actividad antibacteriana de biocidas 106
OBJETIVOS 106
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 106
1. Definición de compuestos biocidas 106
2. Clasificación de biocidas 106
3. Factores que afectan la actividad del biocida 107
3.1. Factores microbiológicos 107
3.2. Factores físico-químicos 109
4. Evaluación de agentes biocidas 111
4.1. Tipos de pruebas de desafíos 112
BIBLIOGRAFÍA 117
ACTIVIDADES DE DESARROLLAR 117
10 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos 122
OBJETIVOS 122
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 122
1. Tipos de antimicrobianos 122
2. Tipos de efectos antimicrobianos 123
3. Mecanismos moleculares de acción de los antimicrobianos 124
4. Pruebas de sensibilidad 124
4.1. Pruebas de dilución 124
4.2. Pruebas de difusión 126
4.3. Informe de resultados 128
4.4. Determinación de actividad bactericida 129
4.5. Curvas de muerte 130
4.6. Poder bactericida del suero 130
BIBLIOGRAFÍA 130
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 130
11 Detección de mecanismos de resistencia antimicrobiana 134
OBJETIVOS 134
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 134
1. Factores que contribuyen a la aparición de resistencia a antimicrobianos 134
2. Resistencia intrínseca y adquirida 135
2.1. Resistencia intrínseca 135
2.2. Resistencia adquirida 136

3. Elementos involucrados en la transferencia horizontal de la resistencia 136
3.1. Plásmidos 136
3.2. Transposones 137
3.3. Integrones 138
4. Mecanismos de resistencia 139
4.1. Destrucción o modificación enzimática del antibiótico 139
4.2. Exclusión 140
4.3. Alteración de sitios blanco 141
4.4. Modificación de la vía metabólica 142
5. Detección de mecanismos de resistencia 142
5.1. Métodos fenotípicos de detección 142
5.2. Métodos genotípicos de detección 144
BIBLIOGRAFÍA 145
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 146
12 Producción de antimicrobianos naturales de interés farmacéutico 150
OBJETIVOS 150
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 150
1. Metabolismo microbiano 150
2. Búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos 151
2.1. Aislamiento de la cepa productora 153
2.2. Búsqueda de la actividad antimicrobiana 154
2.3. Identificación del microorganismo y mejoramiento genético 157
2.4. Análisis de la estructura química, ensayo de actividad y toxicidad en animales 158
2.5. Producción y optimización de los procesos fermentativos 158
2.6. Procesamiento post-fermentación 159
2.7. Escalado industrial 160
3. Modernas estrategias en la búsqueda de nuevos antibióticos 160
3.1. Minería genómica para detectar nuevos antimicrobianos 161
3.2. Metagenómica ambiental 161
3.3. Técnica “una cepa muchos compuestos” 161
3.4. Biosíntesis combinatoria 161
3.5. Biología sintética 162
BIBLIOGRAFÍA 162
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 162
13 Productos inmunológicos 166

OBJETIVOS 166
INTRODUCCIÓN TEÓRICA 166
1. Productos Hemoderivados 166
1.1. Inmunosueros 166
1.2. Inmunoglobulinas humanas 167
1.3. Control de calidad de hemoderivados 168
2. Anticuerpos Monoclonales 168
2.1. Producción por la técnica del hibridoma 169
2.2. Tipos de anticuerpos monoclonales 169
2.3. Nomenclatura 170
3. Vacunas 171
3.1. Clasificación de las vacunas 171
3.2. Producción de vacunas bacterianas 174
3.3. Producción de vacunas virales 177
3.4. Preparado de la vacuna final (bacterianas y virales) 178
3.5. Vacunas combinadas 180
3.6. Control de calidad 181
BIBLIOGRAFÍA 182
ACTIVIDADES A DESARROLLAR 183

Reglamento interno de la cátedra

Inscripción

A los efectos de garantizar la integración de contenidos, podrán ser inscriptos en Microbiología General y Farmacéutica aquellos estudiantes que reúnan las condiciones establecidas en las reglamentaciones de acuerdo al plan de estudio vigente.

Citaciones y notificaciones

Las citaciones y notificaciones se realizarán a través de la cartelera de la asignatura, correo electrónico, el sitio on-line vigente y/o red social.

Concurrencia a Trabajos Prácticos de laboratorio

La asignatura consta de 13 Trabajos Prácticos, el estudiante que no asista a alguno de ellos perderá el derecho a la realización de la práctica en ese o cualquier otro turno, debiendo recuperar el cuestionario en la fecha fijada oportunamente. La concurrencia a los Trabajos Prácticos deberá cumplimentarse en el horario que se indique. Una demora que supere los 5 minutos se computará como inasistencia.

Todo estudiante deberá presentarse provisto de guardapolvo, calzado cerrado, guía didáctica correspondiente, cuaderno de notas y material auxiliar de trabajo (repasador, encendedor y marcador al solvente). En cuanto a su cuidado personal, deberá presentar el cabello recogido en caso de tenerlo largo y las uñas prolijamente cortas y limpias. Dado que estas condiciones son exigidas por razones de bioseguridad, no se permitirá el ingreso de estudiantes que no cumplan dichas condiciones, dando por no aprobado el trabajo práctico. Además, deberá respetar las pautas microbiológicas que sean necesarias en cada caso y al finalizar cada práctico deberá entregar el material limpio y ordenado.

Aprobación y recuperación de los Trabajos Prácticos de Laboratorio

El estudiante deberá mostrar pleno conocimiento de los conceptos referentes al Trabajo Práctico al ser evaluado en forma escrita u oral durante el práctico.

Los estudiantes deberán aprobar el 100% de las evaluaciones escritas, disponiendo de 3 recuperaciones. Para tener derecho a dichas recuperaciones deberá asistir a la jornada completa y aprobar de primera instancia el 75% de los Trabajos Prácticos, aun cuando las inasistencias sean justificadas.

Aprobación y recuperación de exámenes parciales

Los exámenes parciales son dos. El estudiante deberá aprobar el 100% de los parciales propuestos en las fechas y horarios establecidos, teniendo derecho a recuperarlos según el Régimen académico (Ord. 13/03 y modificatorias Ord. 04/15 y 32/14). El porcentaje de aprobación de la evaluación parcial se establece en un 70%.

Aprobación final de la asignatura

De acuerdo a las reglamentaciones vigentes, la regularidad de la asignatura se alcanzará con la aprobación del 100% de los trabajos prácticos y de los exámenes parciales.

1 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología

OBJETIVOS

1) Reconocer los riesgos durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología.
2) Conocer las vías de exposición a agentes biológicos más comunes en el laboratorio.
3) Identificar las normas de bioseguridad, elementos de protección personal/medioambiental y el funcionamiento y manejo de las distintas clases de cabinas de seguridad biológica.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Peligro, riesgo biológico y bioseguridad

Llamamos **peligro** a todo objeto o situación con potencial de causar efectos adversos luego de exponerse a él. En el laboratorio de Microbiología, hay peligros de tipo físicos, químicos, como en cualquier laboratorio, pero además existe un **peligro biológico,** cuyo símbolo internacional de alerta se ilustra en la Figura 1.

Figura 1: Símbolo internacional de peligro biológico. Nota: Imagen de dominio público

Este último se debe a la manipulación de **agentes biológicos** (bacterias, hongos, parásitos, virus, priones, naturales o genéticamente modificados). Dichos agentes causan: infecciones, enfermedades infecciosas, alergia y toxicidad en el personal del laboratorio. Asimismo, pueden crear un peligro para la comunidad y el medioambiente, debido a su **transmisibilidad**, es decir, su capacidad de diseminarse de una persona o animal a otro individuo para causar enfermedades infecciosas.

De acuerdo a la cuarta edición del manual de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (OMS-2020), la **bioseguridad** son los principios, tecnologías y prácticas que se implementan para prevenir la exposición a agentes biológicos o su liberación inadvertida. Esta nueva edición se enfoca en evaluar exhaustivamente el riesgo real que está afectado por el propio agente, el procedimiento a realizar y la competencia del personal técnico que ejecuta la tarea.

Una **infección** implica la colonización de un huésped e incluye la entrada, desarrollo y multiplicación de un agente patógeno y depende del número de dicho agente que se denomina **dosis infecciosa.** Si luego de la infección surge un daño en dicho huésped se produce una **enfermedad infecciosa** que se caracteriza por la aparición de signos y síntomas específicos de cada agente.

2. Vías de exposición comunes

Los agentes biológicos que se manipulan dentro del laboratorio podrán ingresar al individuo por una o varias de las siguientes cuatro vías de exposición.

- ➔ *Inhalación a través del tracto respiratorio:* esta vía aérea es la más importante. El 80% de las infecciones adquiridas en el laboratorio ocurren por la inhalación de partículas líquidas o sólidas denominadas **aerosoles o gotas** que transportan agentes biológicos y son inhaladas por el huésped. Los **aerosoles** tienen un tamaño menor a 10 micrómetros y se mantienen suspendidos en el aire por largos períodos, cuando son inhalados por el huésped pueden llegar hasta el pulmón. Por su parte, las **gotas** de tamaño mayor tienden a caer y contaminar las superficies cercanas; en caso de ser inhaladas sólo alcanzan el tracto respiratorio superior (hasta la laringe). Dichas partículas difieren en tamaño y pueden ser generadas intencional o inadvertidamente en diferentes prácticas tales como:
  - ◆ Incinerar en el mechero el ansa microbiológica cargada con agente biológico.
  - ◆ Producir salpicaduras: por actividades como expulsar con fuerza líquidos de las puntas de las pipetas, abrir tubos sin cuidado, mezclar con vórtex a alta frecuencia, mezclar generando espuma, centrifugar, sonicar.
  - ◆ Producir finas nubes de polvo al abrir viales con cultivos sólidos liofilizados.
- ➔ *Ingestión:* la exposición ocurre a través de la vía digestiva y es causada por el contacto entre las manos contaminadas y la boca o por malas prácticas como el pipeteo con la boca.
- ➔ *Lesiones percutáneas:* el agente biológico ingresa a través de heridas en la piel causadas por la manipulación de objetos cortopunzantes como tijeras, agujas, jeringas con agujas, cuchillas, bisturíes o vidrios rotos.
- ➔ *Absorción:* Las gotas o aerosoles conteniendo agentes biológicos ingresan por las mucosas nasal y conjuntiva mediante el contacto entre las manos contaminadas y la nariz u ojos.

3. Factores que afectan el riesgo biológico

Para saber si un peligro realmente causará daño debe evaluarse el riesgo analizando una combinación entre dos parámetros: **probabilidad** de que ocurra un incidente y **gravedad** de que el peligro cause daño, lesión o enfermedad si ese incidente llegara a ocurrir. Existen diversos factores que pueden incrementar uno o ambos parámetros (Figura 2).

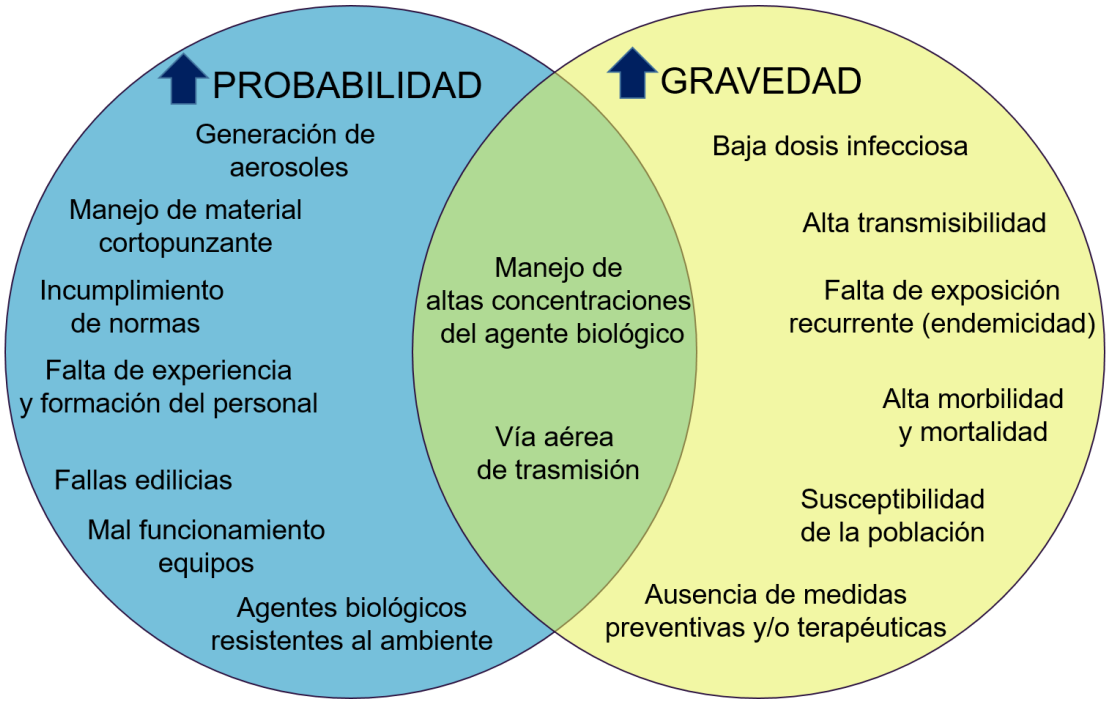


Figura 2. Factores que incrementan el riesgo de que ocurra un incidente biológico. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

Además de las vías de exposición y patogenicidad del agente, deben considerarse otros aspectos. Por ejemplo, la contaminación de superficies con bacterias que forman esporas puede ser una fuente de exposición involuntaria, ya que estos microorganismos permanecen viables por largos periodos y resisten condiciones ambientales extremas.

Asimismo, los agentes patógenos a los que la población no ha estado expuesta en forma recurrente, es decir no son endémicos, aumentan el riesgo de propagación de infecciones.

Es crucial la formación continua y la idoneidad del personal, considerando su susceptibilidad individual frente a agentes biológicos, influenciada por su respuesta inmunológica y estado de salud general.

Finalmente, las condiciones edilicias adecuadas, el correcto funcionamiento del equipamiento y la disponibilidad de tratamiento antimicrobiano o vacunas son esenciales para reducir riesgos. Respecto del personal, debe ser idóneo, formarse continuamente y cumplir con los procedimientos microbiológicos y normas de bioseguridad.

4. Evaluación de riesgos y normas de bioseguridad

Para poder definir medidas de control de riesgo, primero se realiza la evaluación del **riesgo inicial** asociado a los procedimientos de laboratorio. Para ello debe conocerse la probabilidad y la gravedad de los incidentes en ausencia de cualquier medida de control. Luego, al aplicarse las medidas de control a través de normas de bioseguridad permanecerá un **riesgo residual**. Es importante saber que los riesgos nunca se pueden eliminar por completo a menos que el trabajo no se lleve a cabo. Por regla general, cuanto mayor sea el riesgo inicial,

mayor será el número de medidas de control de riesgos necesarias para continuar con el trabajo alcanzando un **riesgo aceptable**. Las medidas se agrupan en tres niveles: requisitos básicos, control reforzado o máxima contención (Tabla 1).

Tabla 1. Matriz de evaluación de riesgo iniciales y medidas de control*

		Probabilidad de exposición o diseminación		
		Improbable	**Posible**	**Probable**
Gravedad o consecuencias negativas de la exposición o la diseminación	**Severa**	**Intermedio (Control reforzado)**	**Alto (Control reforzado)**	**Muy Alto (Máxima contención)**
	Moderada	**Bajo (Requisitos básicos)**	**Intermedio (Requisitos básicos)**	**Alto (Control reforzado)**
	Despreciable	**Muy bajo (Requisitos básicos)**	**Bajo (Requisitos básicos)**	**Intermedio (Control reforzado)**

*La denominación de las medidas de control para cada caso se encuentra entre paréntesis.

Para implementar medidas de control se podrán utilizar tres enfoques basándose en:

- ➔ *Actividades:* depende de los procedimientos que se realizan. Por ejemplo, todo el trabajo relacionado con el ADN recombinante.
- ➔ *Listas:* se crea una lista de agentes biológicos y se aplican reglamentos en base a ella.
- ➔ *Grupos de riesgo* (Tabla 2)*:* es un sistema de clasificación empleado por la OMS desde 2004 que divide a los microorganismos en cuatro grupos según:
  1) Riesgo individual al que se expone el personal que manipula dichos agentes.
  2) Riesgo comunitario debido a la posible diseminación desde el laboratorio a la comunidad externa y al medio ambiente.
  3) Disponibilidad de medidas preventivas (vacunas) y/o terapéuticas (antibióticos).

Tabla 2. Grupos de riesgo biológico, según OMS 2004

Grupo	Riesgo	Características
1	*riesgo individual y poblacional: BAJO O DESPRECIABLE*	Microorganismos con pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
2	*riesgo individual: MODERADO riesgo poblacional: BAJO*	Agentes patógenos que pueden provocar una infección y enfermar al personal. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Posee pocas probabilidades de propagarse a toda la población o al ambiente.
3	*riesgo individual: ELEVADO riesgo poblacional: BAJO*	Agentes patógenos que generalmente provocan enfermedades graves al personal. También, existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Su propagación es limitada al igual que el grupo 2.
4	*riesgo individual y poblacional: ELEVADO*	Agentes patógenos que provocan enfermedades graves en el ser humano o los animales y poseen alta transmisibilidad. No existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

4.1. Requisitos básicos

Describe las medidas que son la base integral de las normas de bioseguridad incluso cuando los riesgos asociados son despreciables. **Serán las normas que seguiremos durante el resto de los trabajos prácticos.**

Las **mejores prácticas** son comportamientos esenciales para facilitar procedimientos seguros y lograr controlar los riesgos biológicos.

1) **Siempre reportar los incidentes al personal responsable, no importa lo insignificante que puedan parecer.**
2) **Realizar el trabajo con cuidado y sin prisas, manteniendo el área de trabajo ordenada, limpia y libre de objetos y materiales no esenciales.**
3) Utilizar correctamente los elementos de protección personal como se explica en el apartado específico.
4) Nunca almacenar alimentos, bebidas o artículos personales en el laboratorio. No comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos y llevar lápices o lapiceras a la boca.
5) Independientemente del uso de guantes, **lavar bien las manos** después de manipular material biológico, antes de salir del laboratorio o cuando se sepa o se crea que las manos están contaminadas. Para ello, humedecer las manos con agua preferiblemente

templada, aplicar jabón líquido con dosificador. Frotar palma contra palma, palma sobre dorso, espacios interdigitales y muñecas durante al menos 10 segundos. Enjuagar con abundante agua. Secarse con toalla desechable y cerrar el grifo con la misma toalla. En algunos casos, puede requerirse un lavado de manos con solución antiséptica.

6) **Garantizar el correcto rotulado** de los agentes biológicos para prevenir confusiones.
7) Asegurar que los suministros se almacenen de forma segura para reducir accidentes e incidentes como derrames, tropiezos y caídas.
8) Proteger los documentos escritos de la contaminación mediante cubiertas de plástico que permitan la desinfección.
9) Prohibir el uso de auriculares que distraen o impiden oír las alarmas.
10) Quitar cualquier joya que pueda rasgar los guantes o contaminarse fácilmente.
11) No usar dispositivos electrónicos portátiles (teléfonos móviles, tabletas, computadoras portátiles, cámaras, entre otros) salvo que se requiera en el procedimiento.

Por otra parte, se emplean **procedimientos técnicos**, que dependen de la vía de exposición y previenen la contaminación cruzada entre muestras y la exposición del personal. **Como regla general, se tratan a todos los microorganismos como agentes patógenos potenciales o contaminantes para los cultivos vecinos.**

➔ *Aérea-Inhalación*

1) Minimizar la formación de aerosoles y gotitas al manipular muestras evitando expulsar por la fuerza líquidos de las puntas de las pipetas, mezclar demasiado y abrir los tubos sin cuidado.
2) Enfriar las ansas esterilizadas a la llama antes de introducirlas en los cultivos, un ansa caliente puede provocar salpicaduras de material infeccioso. De ser posible reemplazar las ansas metálicas por ansas plásticas desechables.

➔ *Digestiva-ingestión*

1) **Prohibir el pipeteo con la boca.** Se usarán siempre los dispositivos mecánicos.
2) Usar guantes desechables cuando manipule muestras que se sepa o se espere que contengan agentes biológicos. Estos no deben reutilizarse.
3) Evitar el contacto de las manos enguantadas con la cara.
4) Quitarse los guantes asépticamente después de usarlos y lavarse las manos como se describió previamente.
5) Cubrir la boca, los ojos y la cara cuando aumente el riesgo de producir salpicaduras.
6) Utilizar el cabello recogido para evitar la contaminación.
7) Cubrir cualquier herida en la piel con un vendaje adecuado.

➔ *Percutánea-inyección*

1) Cuando sea posible, reemplazar cualquier material de vidrio con material de plástico.
2) Usar tijeras u otros materiales cortopunzantes con extremos romos o redondeados.
3) Verificar regularmente la integridad del material de vidrio desechando los materiales rotos, agrietados o astillados.
4) Utilizar abridores de ampollas para una manipulación segura.
5) Nunca utilizar jeringas con agujas como alternativa a los dispositivos de pipeteo.
6) Nunca volver a tapar o quitar las agujas de las jeringas desechables. Deben desecharse en recipientes resistentes a las perforaciones provistos de tapas selladas que no deben llenarse por completo ni reutilizarse.

➔ *Dispersión o diseminación*

1) Colocar recipientes para depositar desechos en cada estación de trabajo.
2) Vaciar regularmente los contenedores de residuos y eliminarlos de forma segura.
3) Desinfectar las superficies con un desinfectante antes y después de realizar los procedimientos microbiológicos y siempre que se derrama algún material. Asegurar un tiempo de contacto adecuado para cada caso.

4.2. Equipos de protección personal

Son un conjunto de elementos de uso individual que proporcionan una barrera primaria siempre y cuando se utilicen correctamente.

- ➔ *Guardapolvos:* deben abrocharse correctamente, ser de mangas largas con puños ajustados y de largo hasta las rodillas. No almacenarlos junto a objetos personales.
- ➔ *Calzado*: debe cubrir y ajustar el pie y evitar resbalones o tropiezos.
- ➔ *Guantes:* de nitrilo, vinilo y látex cuya integridad debe verificarse antes de colocarlos y deben ajustarse perfectamente a la mano sin apretar ni quedar sueltos.
- ➔ *Protección ocular*: las gafas de seguridad y viseras faciales evitan la exposición por salpicaduras e impacto de objetos. Deben desinfectarse luego de usarlos. Los anteojos recetados no deben reemplazar a las gafas de seguridad. **En caso de utilizar lentes de contacto es obligatorio el uso de gafas de seguridad en todo momento.**
- ➔ *Protección respiratoria:* cuando una evaluación de riesgos indica que se necesita el uso de protección respiratoria, se considera una medida de control reforzada.

Asimismo, deben existir botiquines de primeros auxilios bien equipados y de fácil acceso, duchas, estaciones de lavado de ojos, mantas ignífugas, matafuegos, soluciones desinfectantes, kit antiderrames, entre otros.

4.3. Medidas de control reforzadas

Contempla las prácticas adicionales que dependen de situaciones especiales de riesgo. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de medidas de control reforzadas.

1) Acceso restringido, sólo ingresa el personal capacitado que debe estar vacunado.
2) Cierre y sellado de ventanas.
3) Instalar un espacio para el tratamiento in situ de los desechos.
4) Usar batas desechables sobre el guardapolvo y cubrir el calzado antes de ingresar al laboratorio.
5) Utilizar equipos de protección respiratoria y una cabina de seguridad biológica.

4.4. Medidas de máximas de contención

Los laboratorios ofrecen el mayor nivel de protección al personal, la comunidad y el medioambiente. Son muy costosos de construir, operar y mantener, se deben utilizar cuando se manipulan agentes biológicos del grupo de riesgo 4 o aquellos con evidencia de potencial pandémico. A todas las medidas de niveles de control anteriores se agregan:

1) Utilizar cabinas de seguridad biológica de clase III.
2) El personal debe cambiarse la ropa y zapatos antes de entrar y salir del laboratorio. Deberán usar trajes con presión interna positiva, provistos de suministro externo de aire. Además, debe ingresar a una cabina de ducha química para descontaminar dicho traje a la salida.
3) El personal debe estar capacitado en los procedimientos de extracción de emergencia en caso de lesión o enfermedad del personal y no se le permite trabajar solo.
4) Se debe establecer un método de comunicación para contactos de rutina y de emergencia entre el personal que trabaja en el laboratorio de medidas de máxima contención y el personal de apoyo fuera del laboratorio.
5) Se debe monitorear y registrar visualmente las actividades.

5. Cabinas de seguridad biológica

Las cabinas de seguridad biológica (CSB) son recintos de trabajo cerrados y ventilados. Estos dispositivos protegen al operador, el ambiente del laboratorio y/o los materiales de trabajo de la exposición a aerosoles infecciosos y salpicaduras que puedan generarse al manipular materiales que contienen agentes biológicos. Todos poseen presión interna negativa para que el aire entre a la cabina (clase I y II) o se mantenga en el interior (clase III).

5.1. CSB de clase I

Son recintos con una abertura frontal que atraen un flujo de aire hacia adentro y hacia arriba a través de un filtro de aire de partículas de alta eficiencia (HEPA) antes de ser

expulsado al exterior. Protegen al personal y al medio ambiente, pero no protegen los materiales, ya que el aire que ingresa no es previamente filtrado (Figura 3a).

5.2. CSB de clase II

Se subdividen en varios subtipos, todos poseen dos filtros HEPA, a diferencia del anterior, y ofrece protección:

1) Al operador: porque posee presión interna negativa para que el aire ambiental ingrese al gabinete a través de la abertura frontal y no salga.
2) Al producto: el aire ingresado entra a una rejilla frontal, pasa por debajo de la mesada de trabajo, sube y atraviesa un filtro HEPA que lo esteriliza y lo recircula nuevamente al área de trabajo en forma de flujo laminar, para evitar la contaminación cruzada.
3) Al medio ambiente: parte del aire pasa por un segundo filtro, ubicado por encima del primero, y lo expulsa al exterior esterilizado (Figura 3b).

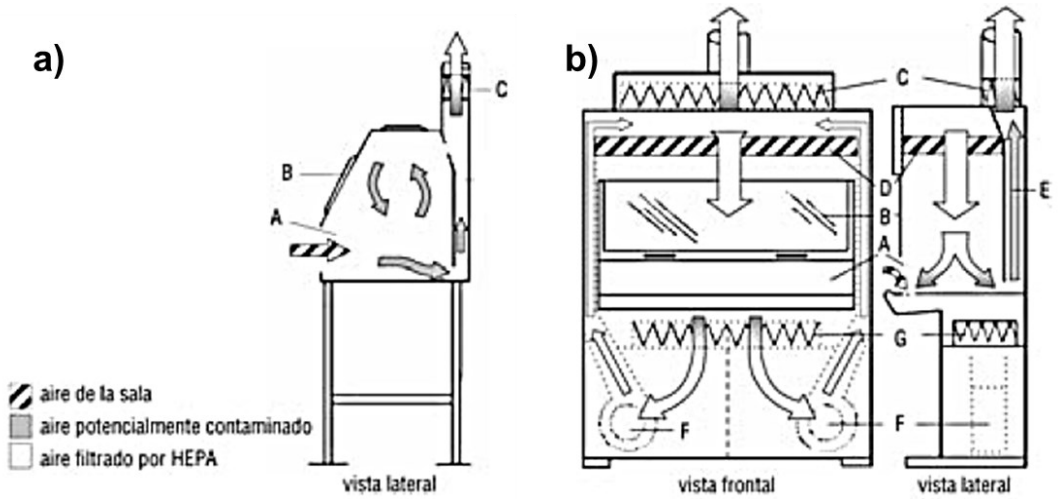


Figura 3. Cámara de Seguridad Biológica clase I **(a)** y clase II **(b)**. A. abertura frontal, B. ventana de cristal, C. filtro HEPA de salida, D. filtro HEPA de entrada, E. cámara de distribución de salida con presión negativa, F. ventilador, G. filtro HEPA aire entrada. Nota: Nota: Adaptado de, Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. Reproducido con permiso.

5.3. Cabina de clase III

Son recintos cerrados, sellados, con guantes integrados. El aire ingresa por la parte superior y atraviesa un filtro HEPA; este aire estéril circula por la cabina y luego pasa a través de otro filtro HEPA que garantiza una descontaminación que protege al medio ambiente. Además, posee dos sistemas de esterilización: un autoclave acoplado y un tanque de inmersión química para la gestión de los desechos dentro del mismo gabinete. (Figura 4).

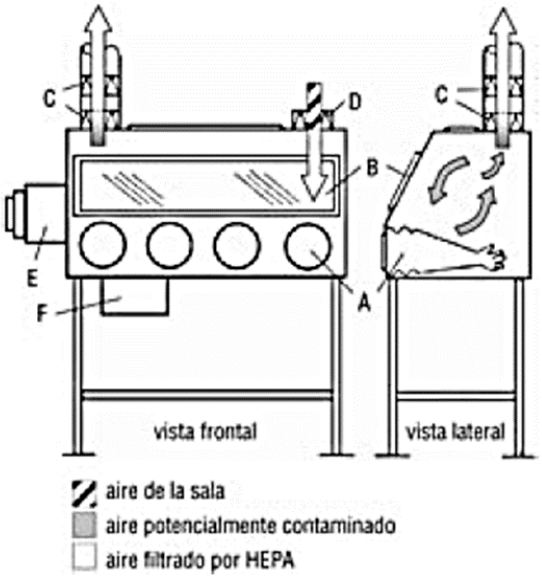


Figura 4. Cámara de Seguridad Biológica clase III. A. orificio para guante del largo de un brazo, B. ventana, C. doble filtro HEPA de salida, D. filtro HEPA de entrada, E. autoclave de doble puerta o caja de paso, F. tanque de inmersión química. Nota: Adaptado de, Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. Reproducido con permiso.

6. Gestión de residuos en el laboratorio de Microbiología

En general, muchos de los desechos producidos por los laboratorios biológicos, de análisis clínico y proveedores de atención de salud se asemejan a la basura doméstica y se denominan **residuos comunes o no peligrosos que se recolectan en bolsas negras**. Un ejemplo, corresponde al papel poroso que envuelve material para esterilizar u envoltorios de materiales descartables estériles como jeringas o pipetas plásticas, siempre y cuando no se contaminen accidentalmente podrán descartarse en una bolsa negra. En cambio, **los desechos peligrosos, patológicos o patogénicos** pueden representar un riesgo para la salud humana y el medio ambiente y deben tratarse de manera especial. El **desecho infeccioso que se recolecta en bolsas rojas,** es el principal desecho peligroso producido en un Laboratorio de Microbiología y consiste en residuos que se sospecha o que realmente contienen microorganismos patógenos, incluidos los cultivos de laboratorio y las cepas de microorganismos. En nuestro país, el manejo es normado por la Ley Nacional de residuos peligrosos N° 24.051 (1992), y la Provincia de San Luis adhiere por la Ley N° IX0335-2004.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Se explicarán los aspectos más importantes relacionados con la bioseguridad en el laboratorio de Microbiología y el funcionamiento y modo de operar un GSB clase II.

BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA

Fundación InvestigaciónHGUV. (2020, abril 8). ¿Cómo quitarse los guantes de manera segura? [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=9cunnq70L2U

Gestión & Formación. (2018, diciembre 2). Precauciones Universales de Bioseguridad [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=0dMZyPB2Gko

Grupo Gamma. (2020, marzo 17). Higiene de manos: Técnica lavado con agua y jabón o antiséptico. Grupo Gamma [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=k4rJs_5rmmw

Laboratorios LBC Ltda. (2016, junio 8). Gabinetes de bioseguridad [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=dmpjHzZIRE4

MicroBIOblog (Ignacio López-Goñi). (2019, enero 14). #microBIOscope: en el laboratorio de bioseguridad [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=r-euia07GOg

Organización Mundial de la Salud. (2022). Gestión segura de los residuos de la atención de salud: resumen. Organización Mundial de la Salud. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Robert Koch-Institut. (2019, julio 31). Working in the BSL-4 laboratory [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=xnNohYMkuAE

World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety manual, fourth edition and associates monographs. World Health Organization. Geneva. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2 Esterilización y medios de cultivo

OBJETIVOS

1) Diferenciar los alcances del calor húmedo y seco como agentes esterilizantes y detallar los indicadores de control del proceso de esterilización.
2) Comprender los principios de la esterilización por filtración.
3) Conocer la composición y función de nutrientes en los medios de cultivo, así como las condiciones ambientales que influyen en el cultivo de microorganismos.

ESTERILIZACIÓN

1. Definición y aplicaciones

La Farmacopea Argentina séptima edición (Volumen IV, apartado <475>) define **esterilización** al proceso validado por medio del cual se obtiene un producto libre de microorganismos **viables,** es decir vivos y capaces de multiplicarse.

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, entre otros. 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 al uso de estos artículos.

El objetivo de un proceso de esterilización en el ámbito hospitalario es destruir todos los microorganismos para asegurar que permanezca libre de riesgo biológico y así prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas. La eficacia de dicho proceso depende de la elección apropiada del método de esterilización en base a los artículos a ser esterilizados ya que existe un riesgo potencial de deterioro de ciertos materiales. Por lo tanto, un proceso de esterilización debe seleccionarse para alcanzar la máxima eliminación/muerte del microorganismo con el mínimo deterioro del producto a esterilizar. En el caso de los medios de cultivo, debido a que el agua destilada que se emplea en su preparación contiene microorganismos, su eliminación, evita la competencia por los nutrientes, permitiendo el desarrollo específico de los microorganismos de la muestra que se siembra en dicho medio. En la industria biotecnológica la esterilización de biorreactores y medios de cultivo evita contaminación biológica que puede afectar el rendimiento del metabolito que se desea producir (ej. antibióticos, enzimas, proteínas, anticuerpos, entre otros).

2. Clasificación de los métodos de esterilización

Los métodos de esterilización podrán ser físicos (calor, radiación, filtración) o químicos (Figura 5).

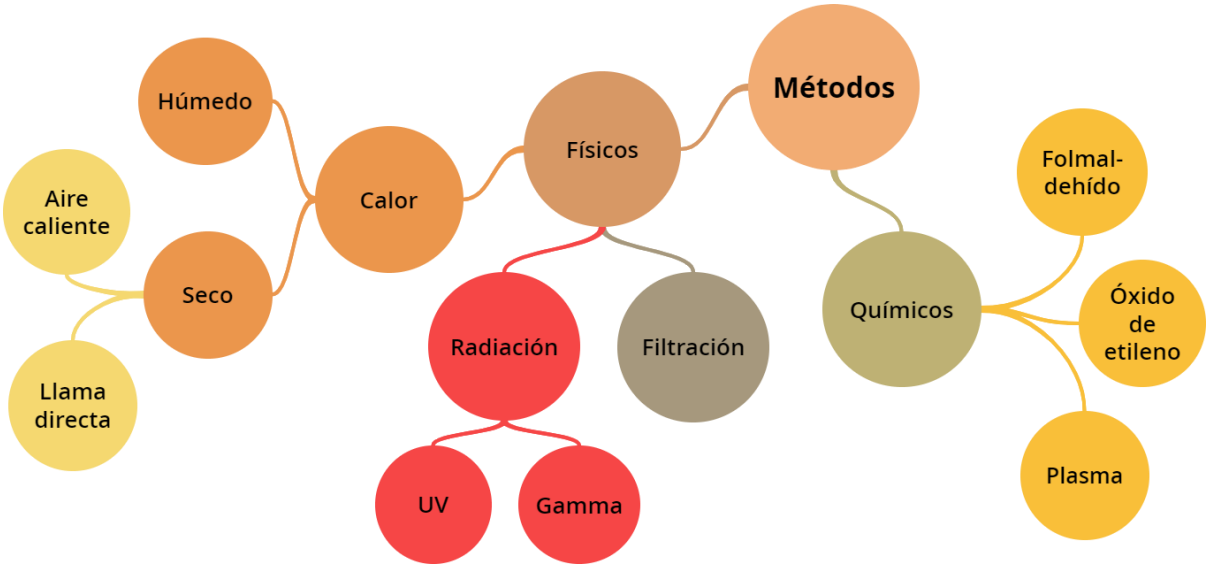


Figura 5. Clasificación de los métodos de esterilización. Nota: imagen creada por Mg. Verónica Gómez y Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA.

3. Esterilización por calor

La esterilización por calor, siempre que su aplicación no afecte la resistencia o estabilidad de los materiales, es el sistema de elección por ser el más seguro, eficaz y mejor estudiado.

3.1. Esterilización por calor húmedo-Autoclave Chamberland

En este método la causante de la muerte celular es la **coagulación de las proteínas y enzimas celulares**, **ruptura de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y pérdida de material de bajo peso molecular.** El agente esterilizante en este caso es el **vapor saturado bajo presión** que se genera dentro de artefactos conocidos como **autoclaves Chamberland.**

El calor húmedo actualmente encuentra una amplia aplicación en el procesamiento de muchos productos termoestables, incluyendo ciertos plásticos que se utilizan en materiales descartables. 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. En el laboratorio de Microbiología es un procedimiento esencial que se emplea en todo el material que se utiliza en los procedimientos microbiológicos (medios de cultivos, pinzas, tijeras, envases, pipetas y placas de Petri), debido a que debe evitarse la contaminación de los microorganismos que se cultivan con microorganismos ambientales. Sea cual sea la naturaleza de la carga, el producto se ubica en bandejas o jaulas para optimizar la distribución del vapor que debe proveer humedad y calor a los artículos a esterilizar. Esto se logra usando vapor saturado a alta temperatura, es

decir, vapor en equilibrio térmico con el agua de la cual deriva. Para ello, es necesario generar vapor por encima de la presión atmosférica, por ejemplo, para alcanzar 121 °C la presión absoluta deberá ser de 2 atm (1 atm dentro del autoclave más 1 atm en el ambiente). El calor húmedo posee ventajas sobre el calor seco ya que 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.

El autoclave es un equipo de esterilización que generalmente cuenta con paredes dobles, lo que permite distribuir uniformemente el calor y la presión. En los diseños tradicionales tienen un doble fondo donde se coloca el agua. El sistema de calefacción está ubicado en la parte inferior, y la tapa superior tiene un cierre hermético, el cual puede lograrse mediante charnelas tipo mariposa o una rueda de seguridad con burlete de sellado, según el diseño del autoclave. Sobre la tapa se encuentran: una espita para la salida del vapor, un manómetro para medir la presión interna y una válvula de seguridad que libera presión en caso de sobrepresión. El tambor interno, donde se coloca el material a esterilizar, puede ser de orientación horizontal o vertical, dependiendo del modelo del autoclave.

Figura 6. Autoclaves tipo Chamberland verticales: a) sistema a gas, b) sistema de calefacción eléctrica. Partes: 1) mariposas o charnelas, 2) manómetro, 3) espita, 4) válvula de seguridad, 5) paredes dobles, 6) fuente de calor. Nota: Imágenes tomadas por Dr. Gabriel Salinas Ibáñez, bajo licencia CC-BY-SA.

3.1.1. Manejo del autoclave

1) **Colocar una cantidad de agua suficiente** para generar vapor durante todo el proceso. Dicha cantidad dependerá del modelo del equipo.
2) **Acomodar el material previamente acondicionado:** el material de vidrio como placas de Petri y pipetas deben envolverse en papel poroso (papel manteca, blanco o Kraft) para permitir el paso del vapor. Los recipientes con tapa a rosca (tubos o frascos) deben colocarse con las tapas ligeramente aflojadas para permitir la entrada de vapor y evitar la formación de vacío.

3) **Asegurar el cierre hermético de la tapa** ajustando las charnelas enfrentadas o girando la rueda, según el modelo del equipo. Encender el sistema de calefacción (gas o eléctrico).
4) **Purgar el aire del interior del autoclave:** para ello debe mantener la espita abierta hasta que salga un chorro continuo de vapor visible (blanco), lo que indica que el aire ha sido completamente eliminado. Este paso es esencial porque la presencia de una mezcla aire-vapor reduce la eficiencia de la transferencia de calor e impede una esterilización adecuada.
5) **Cerrar la espita y monitorear el manómetro hasta que indique 1 atmósfera de presión** (lo que corresponde a 121 °C si el autoclave está lleno de vapor de agua saturado).
6) Una vez alcanzada la presión y temperatura adecuadas, **iniciar el tiempo de esterilización según el protocolo correspondiente.** Los ciclos de esterilización más comunes duran 15-20 minutos.
7) Al finalizar el ciclo, **apagar la calefacción y esperar que el manómetro indique cero de presión.** Luego abrir la espita, la tapa y retirar el material. No se debe abrir la espita para acelerar el descenso de la presión.
8) El material se almacenará del siguiente modo: Si es de vidrio debe primero secarse en la estufa, en tanto que los medios de cultivo deben enfriarse y luego conservarse en la heladera (4 °C) hasta su uso para disminuir el riesgo de contaminación microbiana.

3.2. Esterilización por calor seco

El agente esterilizante en este caso es el **aire seco caliente que circula por convección forzada** causando la muerte celular por **oxidación de proteínas y otros componentes celulares**. Es de aplicación reducida, porque las temperaturas requeridas superiores a 160 °C en presencia del aire son resistidas por unos pocos materiales.

3.2.1. Acción directa a la llama

Se utiliza para esterilizar instrumentos de uso ocasional y se aplica:

1) Sometiendo el material a la llama hasta llevarlo al rojo, manteniéndolo así durante cinco a diez segundos. Es útil para objetos de materiales que soporten ser calentados al rojo vivo. Por ejemplo, este método es de uso rutinario para incinerar el ansa microbiológica metálica y así evitar la contaminación durante el trabajo en el laboratorio de microbiología.
2) Remojando el material en etanol y acercando brevemente a la llama para que se encienda. La llama provocada por el etanol genera menor temperatura, por lo que es apropiado para materiales de vidrio como la espátula de Drigalski.

3.2.2. Aire caliente-Estufa de esterilización

El calor seco se aplica con más frecuencia calentando el aire en el interior de una **estufa de esterilización** diseñada especialmente para tal fin. El diseño debe asegurar una distribución homogénea de la temperatura. 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 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. Se debe determinar el tiempo de esterilización a partir del momento en que la cámara y el material alcanzan la temperatura seleccionada. Si bien no es práctico establecer una sola relación temperatura-tiempo, para materiales farmacéuticos y hospitalarios, la Farmacopea Argentina exige ciclos de **170 °C-1 hora o 160 °C-2 horas**.

Este método se usa para materiales con bajo o nulo contenido de agua que no pueden esterilizarse con vapor. Su principal ventaja es obtener productos estériles y secos, como vidrio, acero inoxidable. También se emplea para esterilizar vaselina, aceites o soluciones oleosas, especialmente en envases herméticos. Asimismo, es útil para esterilizar polvos, cuyo bajo índice de conductividad térmica prolonga el tiempo calentamiento.

Los ciclos a temperaturas de 250 °C por al menos 30 minutos se emplean para eliminar sustancias pirógenas (endotoxinas por ejemplo), siempre y cuando el material sea resistente al calor.

4. Filtración esterilizante de fluidos

En el ámbito farmacéutico, la producción a escala industrial de soluciones parenterales con productos sensibles al calor (termolábiles) generó la necesidad de desarrollar un método esterilizante alternativo al calor. Así, a partir de 1929 Sartorius-Werke (Alemania) patentó un sistema de filtración industrial.

A diferencia del calor que destruye la carga microbiana presente en un elemento, la filtración es una operación que **se basa en la separación mecánica de los microorganismos de líquidos o gases.** Dicha separación se logra mediante la utilización de un dispositivo poroso (membrana o cartucho) que los retiene por la acción mecánica fundada en el tamaño de los poros, y por el fenómeno físico de adsorción.

4.1. Esterilización de líquidos

Los filtros podrán ser de dos tipos: **de superficie** (membranas filtrantes) o **de profundidad** (cartuchos de filtración) y en general deben reunir las siguientes condiciones:

- ➢ No alterar la composición ni los caracteres organolépticos del líquido.
- ➢ No ceder materiales solubles al líquido.
- ➢ Retener los microorganismos con seguridad.

- ➢ Tener una porosidad uniforme en toda su superficie, sin generar demasiada 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.

Actualmente, 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 (Figura 7). La resistencia que determina la pérdida de carga en la solución a filtrar se puede vencer ya sea empleando bombas impulsoras del líquido por presión o bien bombas de vacío. El tamaño de poro de la membrana, eficaz para esterilizar es 0,22 µm. En muchos casos pueden emplearse de mayor tamaño (0,45 µm por ejemplo) como prefiltros, dejando los de cerca de 0,22 µm para la esterilización propiamente dicha, evitando que obstruyan sus poros con rapidez.

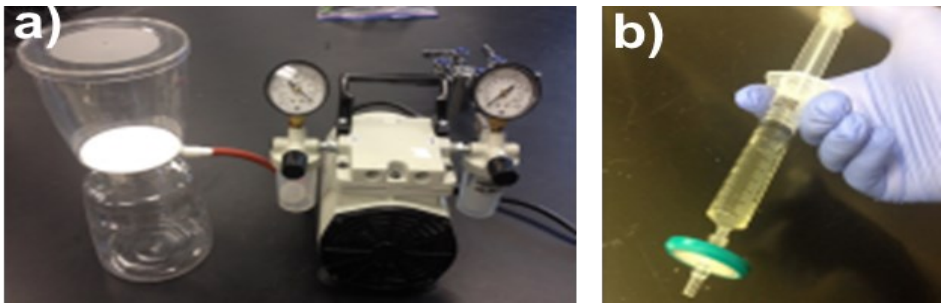


Figura 7. Sistemas de filtración en el laboratorio. **a)** Equipo de filtración **para grandes volúmenes conectado a bomba de vacío, b)** filtro de jeringa descartable para pequeños volúmenes Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

En la práctica de esterilización por filtración de soluciones, la aplicación más común a escala industrial es la destinada a la preparación de inyectables en solución acuosa (especialmente si contienen sustancias termolábiles) fraccionada en ampollas.

En el laboratorio de Microbiología, la filtración puede requerirse para esterilizar medios de cultivo que no soportan la esterilización por calor húmedo, también es útil en investigación para preparar sobrenadantes de cultivo libre de esporas como se verá en el Trabajo práctico N° 11. Para estos casos, se esteriliza por separado el portafiltro armado, de preferencia por vapor a 121 °C durante 20 minutos con todas sus conexiones dispuestas de tal manera que permitan acceso seguro del vapor o del gas. Luego, en un área estéril (mechero o GSB) se coloca asépticamente la membrana filtrante utilizando una pinza estéril. El líquido a filtrar se recibe en un recipiente estéril, que se conecta al filtro, reduciendo las maniobras de conexión al mínimo indispensable.

4.2. Esterilización de gases

La filtración del aire es de extensa aplicación en la industria farmacéutica, biotecnológica, centrales de esterilización y laboratorios microbiológicos. Los filtros de aire pueden utilizarse en áreas estériles y en gabinetes de seguridad biológica y pueden dividirse en dos tipos de acuerdo a la eficacia de la filtración:

1) HEPA del inglés High-Efficiency Particulate Air: retiene el 99,97 % de partículas mayores a 0,3 μm de diámetro.
2) ULPA Ultra-Low Particulate Air: logran eliminar el 99.999% de partículas de hasta 0,1 μm. Sin embargo, son extremadamente costosos y de menor vida útil por eso quedan restringidos a usos muy específicos.

Los filtros en general están compuestos por una sola hoja de fibras de borosilicato plegada para aumentar la superficie total. Los pliegues usualmente están divididos por separadores de aluminio corrugado y se encuentran enmarcados en un soporte de madera, metal o plástico. El flujo directo del aire es forzado a través del filtro en un flujo paralelo uniforme.

Las partículas, incluidos los microorganismos presentes en el aire, son retenidas principalmente por mecanismos físicos como la interceptación (adhesión de la partícula a la fibra por cercanía, el impacto inercial (choque de la partícula con la fibra, para partículas grandes) y la difusión en el caso de las partículas pequeñas.

5. Control del proceso de esterilización

Además de los requerimientos de la validación de los equipos (autoclave o la estufa de esterilización) a través de normas internacionales (ISO, EN), se debe verificar el proceso de esterilización. Para ello se usan diferentes indicadores:

5.1. Indicadores físicos

Son elementos de medida que dispone el equipo para registrar, controlar y documentar en cada ciclo los siguientes parámetros físicos:

1) presión: se miden con manómetro, manovacuómetro, sensor de presión.
2) temperatura: se mide con sensores de temperatura especiales que permiten su uso en autoclaves.
3) tiempo: el equipo posee cronómetro integrado.

Estos elementos se emplean para verificar si se alcanzan los valores correctos de cada parámetro.

5.2. Indicadores químicos

Son sustancias químicas que cambian alguna propiedad (color) frente a variables críticas del proceso (temperatura, humedad, presión, concentración del agente esterilizante). Generalmente, se emplean cintas adhesivas, tiras o tarjetas comerciales que contienen

dichas sustancias y se colocan dentro de los paquetes con el material a esterilizar. Un ejemplo utilizado durante la esterilización con óxido de etileno consiste en colocar un sobre que contiene una solución de $MgCl_2$ en medio sulfúrico y el 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 óxido de etileno 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 óxido de etileno penetró o no dentro de la bolsa.

5.3. Indicadores biológicos

Son de primera elección para verificar la eficacia del proceso de esterilización y consisten en poblaciones de esporas bacterianas estandarizadas en altas concentraciones (10^5-10^7). Su resistencia es igual o mayor que la contaminación normal presente en los productos a esterilizar y la especie varía de acuerdo al método (Tabla 3).

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

- ➔ Se encuentran en mayores cantidades que los presentes normalmente en la muestra.
- ➔ Son más resistentes al proceso de esterilización que la contaminación microbiana normal del material.
- ➔ No son patógenos, no causan enfermedades infecciosas por lo que su uso es seguro.

Estos indicadores se comercializan envasados en ampollas o embebidas en tiras que se colocan en lugares de más difícil acceso para el agente esterilizante. Luego de completar el ciclo de esterilización, se transfieren a medios de cultivo adecuado (Caldo de Tripteína de Soja) y se incuban. Si transcurrido el tiempo de incubación a temperatura adecuada no se observa turbidez en el caldo el ciclo de esterilización fue efectivo, asumiendo que todas las formas de vida de microorganismos han sido eliminadas durante el proceso.

Tabla 3. Indicadores biológicos recomendados por la Farmacopea Argentina (2003)

Método	**Especie**
Calor húmedo plasma de H_2O_2 formaldehído	*Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953
Calor seco	*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372
Radiación ionizante óxido de etileno	*Bacillus pumilus* ATCC 27142

Los filtros esterilizantes deben desafiarse con un bacilo gram-negativo muy pequeño *Brevundimonas diminuta* según la norma ASTM F838-05 y las recomendaciones de la FDA. De este modo se evalúa la eficacia de retención de los filtros.

MEDIOS DE CULTIVO

1. Nutrición y cultivo de microorganismos

En la naturaleza, los microorganismos existen en poblaciones mixtas de diversas especies. Las bacterias, con su gran versatilidad para utilizar distintos nutrientes, se adaptan a diversos nichos ecológicos, asimilando gran variedad de nutrientes y creciendo en condiciones ambientales extremas. Sin embargo, el desarrollo de la Microbiología ha sido posible gracias al estudio de especies aisladas en medios artificiales sin contaminantes.

Cada microorganismo necesita nutrientes y otros requerimientos para su crecimiento y multiplicación, por eso para cultivarlos en el laboratorio se elaboran y esterilizan los **medios de cultivo** que se definen como ambientes nutritivos artificiales que se aproximan lo más posible al hábitat natural o nicho ecológico de los microorganismos.

2. Requisitos nutricionales

Corresponde a **macronutrientes** que se necesitan en cantidades relativamente importantes (aportan C, H, N, O y P), **micronutrientes** requeridos en menores concentraciones (S, Na, K, Ca, Fe y Mg), **oligoelementos** presentes en cantidades de trazas, (Mn, Zn, Co, Ni, Mo y Cu) y **factores de crecimiento.** Estos componentes son comunes a todas las bacterias, aunque difieren en la forma asimilable que debe ser proporcionada al medio de cultivo.

2.1. Fuente de carbono

El carbono es requerido para la síntesis de los componentes celulares (biomasa). Los microorganismos autótrofos requieren únicamente dióxido de carbono. En cambio, los quimioheterótrofos obtienen este elemento a partir de distintos compuestos orgánicos, siendo el principal la glucosa (hidrato de carbono). Algunos microorganismos crecen empleando otros azúcares simples (monosacáridos: fructosa, galactosa; o disacáridos: sacarosa, lactosa, galactosa, en tanto que otros son capaces de metabolizar azúcares complejos como el almidón y la celulosa. Otras fuentes de carbono que pueden adicionarse son los polioles (glicerol, sorbitol, manitol), los ácidos grasos, los ácidos orgánicos (ácido acético y ácido cítrico), entre otros. El etanol puede ser una fuente de carbono para las levaduras que se denominan Crabtree positivas (Ver Trabajo Práctico N° 7: Cinética).

2.2. Fuente de nitrógeno

La forma en la cual se requiere nitrógeno depende de la capacidad enzimática del organismo. En algunos casos, los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden fijar directamente el nitrógeno de la atmósfera. Otras especies utilizan nitratos, nitritos, amoníaco o grupos amino de una fuente orgánica (aminoácidos y proteínas). En el último

caso se adiciona al medio de cultivo peptonas o extractos de origen natural (carne, soya, levadura, malta, entre otros), estas fuentes aportan también carbono, minerales y vitaminas.

2.3. Fuente de hidrógeno y oxígeno

El aire es la principal fuente de oxígeno, los compuestos orgánicos que se han descripto hasta ahora aportan ambos elementos que también son obtenidos del agua que se emplea para preparar el medio (Ver más información en el apartado 5 de factores ambientales).

2.4. Fuente de azufre y fósforo

Algunos microorganismos reducen el sulfato, otros utilizan azufre reducido como sulfuros y tiosulfatos, y algunas bacterias lo obtienen de formas orgánicas (metionina, cisteína). El fósforo se incorpora siempre como sales de fosfato y cumple una función dual: como amortiguador del pH extracelular y como componente requerido para la síntesis de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y ATP.

2.5. Metales

Los micronutrientes y oligoelementos se adicionan como sales minerales. Los oligonutrientes, generalmente, están presentes como contaminantes de los ingredientes del medio de cultivo. Pueden ser esenciales para alguna función, como por ejemplo el género *Bacillus* que requiere manganeso para favorecer la esporulación.

2.6. Factores de crecimiento

Son sustancias esenciales que el organismo es incapaz de sintetizar a partir de los nutrientes disponibles y cumplen roles específicos en la biosíntesis celular. La necesidad de un factor de crecimiento es el resultado de la falta o bloqueo de una vía metabólica en las células, si un microorganismo es incapaz de sintetizar un compuesto indispensable para su crecimiento se denomina **auxótrofo** y requerirá que ese factor se adicione al medio. El fenómeno de auxotrofía surge por mutación, el mutante se denomina auxótrofo, mientras que a **la cepa salvaje se la llama protótrofo**. Ejemplos de factores de crecimiento son: purinas, pirimidinas (para síntesis de ADN y ARN), aminoácidos (para síntesis de proteínas) y vitaminas (cofactores de ciertas enzimas).

3. Componentes opcionales - Agentes solidificantes

Los agentes solidificantes son sustancias mucilaginosas que pueden adicionarse a los medios de cultivo en distintas concentraciones. El más utilizado es el **agar,** un polisacárido ácido que se extrae de algas marinas rojas (agarofitas) formado por agaropectina y agarosa que reúne las siguientes características:

1) Un amplio margen entre la temperatura de fusión (80-100 °C) y solidificación (32-35 °C) hace que permanezca líquido hasta 45-50 °C permitiendo agregar suspensiones microbianas sin afectar su multiplicación.
2) Permanece sólido a 37 °C, temperatura de incubación de la mayoría de las bacterias.
3) Su transparencia facilita la visualización de las colonias.
4) No resulta tóxico para las bacterias, ni es degradado por las mismas.

4. Requisitos Energéticos

Todo organismo viviente requiere una fuente de carbono y una fuente de energía. Según la fuente de energía los microorganismos se pueden clasificar en **fotótrofos** (utilizan la luz) y **quimiótrofos** (utilizan compuestos químicos).

5. Factores ambientales

Además de la fuente nutricional y energética existen condiciones ambientales que también deben controlarse durante el crecimiento microbiano.

5.1. Hidratación y humedad: para el crecimiento de los microorganismos la disponibilidad de agua es esencial para la función de las enzimas involucradas en el metabolismo. Para los medios de cultivo se emplea agua destilada y desionizada, ya que el agua corriente contiene iones calcio y magnesio que pueden precipitar con las sales de fosfatos reduciendo la disponibilidad de fósforo.

5.2. Temperatura: Este factor se regula mediante la incubación en estufas de cultivo especiales. Es importante conocer el rango de temperatura para el desarrollo, ya que cada microorganismo posee temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento. Según la temperatura óptima, los microorganismos se pueden clasificar en:

- ➔ **Psicrófilos**: crecen a temperaturas bajas, inferiores a 20 °C.
- ➔ **Mesófilos**: su temperatura óptima es moderada, crecen entre 20-45 °C. En este rango se encuentran los patógenos del hombre y de la mayoría de los animales.
- ➔ **Termófilos**: su temperatura óptima supera los 45 °C.

5.3. Presión osmótica: el agua representa el 80-90% del peso total de una célula y es fundamental para todos los procesos metabólicos. La disponibilidad de agua, tanto en el medio como en el ambiente, depende de la humedad y de la concentración de solutos disueltos que afectan la presión osmótica. En los medios de cultivo el agregado de NaCl o azúcares afecta la presión osmótica y puede emplearse para seleccionar un tipo específico de microorganismos. Muchos microorganismos son tolerantes a las variaciones de presión osmótica porque poseen paredes celulares rígidas. Los microorganismos **halófilos** necesitan concentración salina muy elevada. Otros solo son **halotolerantes** y soportan un poco de sal. Por otro lado, los **osmófilos** requieren altas

concentraciones de azúcares.

5.4. pH extracelular: los medios de cultivo tendrán un pH ácido, neutro o alcalino según el pH que convenga a los microorganismos que se van a cultivar. Las soluciones amortiguadoras (KPO_4H_2/K_2PO_4H y $HCO_3^-/CO_3^=$) mantienen el pH durante la incubación debido a que el microorganismo libera metabolitos ácidos o básicos durante su crecimiento. Las peptonas amortiguan el pH debido a su carácter anfótero. Es importante ajustar el pH del medio, con HCl o NaOH, al valor recomendado por el fabricante. Para medir el pH se emplean las cintas de pH o el peachímetro. Los microorganismos **neutrófilos** crecen en medio neutro o ligeramente alcalino a pH 5,5-7,9. Mientras que los **acidófilos,** como bacterias ácido lácticas y acéticas, crecen con pH por debajo de 5,5. Los microorganismos que soportan pH básico son **alcalófilos**.

5.5. Condiciones atmosféricas: en función del requerimiento de oxígeno, los microorganismos se pueden clasificar como:

- ➔ **aerobios obligados**: el oxígeno es un nutriente esencial para estas bacterias. Su metabolismo es respiratorio.
- ➔ **microaerófilos**: requieren una pequeña cantidad de oxígeno. Pueden realizar respiración aerobia.
- ➔ **anaerobios facultativos**: pueden crecer en condiciones aerobias (metabolismo respiratorio) como anaerobias (metabolismo fermentativo).
- ➔ **anaerobios aerotolerantes**: crecen en ausencia de O_2 (metabolismo fermentativo) y cuando son expuestos al O_2 no mueren.
- ➔ **anaerobios estrictos**: el O_2 les resulta tóxico. Crecen en medios muy reducidos (sin O_2). Metabolismo fermentativo.

6. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios se pueden clasificar de acuerdo a su composición, origen, consistencia o propósito (Figura 8).

6.1. Medios de cultivo según origen y composición

Los medios complejos contienen peptonas y extractos de origen natural cuya composición de aminoácidos, minerales y vitaminas puede variar lote a lote, en cambio los medios sintéticos presentan una composición definida ya que son elaborados con sustancias con alto grado de purificación. Ambos se consideran medios artificiales en cuanto al origen, mientras que los medios naturales contienen, leche, papa, suero, entre otros componentes que no sufren un procesamiento de hidrólisis como ocurre con las peptonas y extractos.

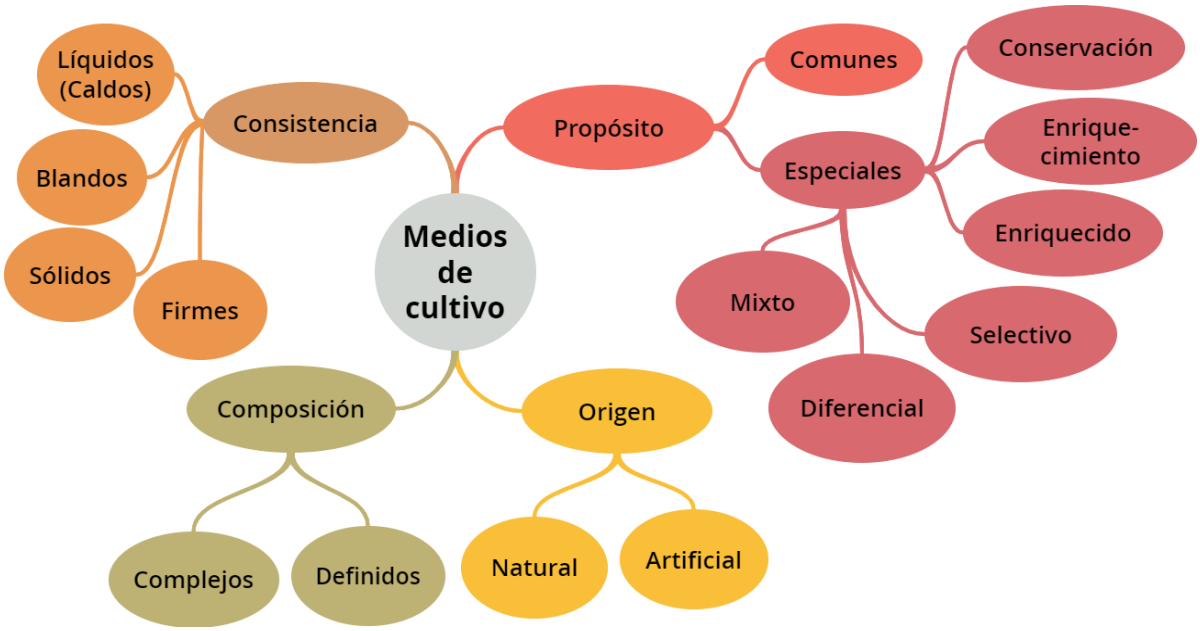


Figura 8. Clasificación de los medios de cultivo. Nota: imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

6.2. Consistencia

De acuerdo a la concentración de agar, los medios de cultivo adquieren distintas consistencias clasificándose en:

- ➔ **Caldos** (caldo nutritivo, tripteína soya caldo): son medios líquidos sin agar.
- ➔ **Semisólidos o blandos** (medio SIM): contienen 2-3 g/L de agar y permiten estudiar la movilidad de los microorganismos.
- ➔ **Sólidos** (agar para recuento, agar Sabouraud): presentan una consistencia considerada normal y contienen 15-20 g/L. Cuando se preparan en placas de Petri permite el aislamiento de microorganismos en forma de colonias, concepto que se desarrolla en el siguiente trabajo práctico.
- ➔ **Firmes:** contienen 50 g/L y se utilizan para detener el crecimiento de microorganismos muy móviles.

6.3. Medios según el propósito

En este caso, se subdividen en **medios comunes** que se emplean en propósitos generales y permiten el desarrollo de microorganismos poco exigentes (ej. agar o caldo nutritivo) o **medios especiales** con usos específicos que se describen a continuación.

6.3.1. Medio de conservación o transporte: aportan un mínimo de nutrientes que mantienen los microorganismos, pero no permiten su multiplicación. Se utilizan cuando no se realiza la siembra inmediatamente de tomada la muestra. Ej. Medio Stuart, medio Cary-Blair.

6.3.2. Medios de enriquecimiento: son medios líquidos (caldos) con nutrientes específicos para el crecimiento de un determinado grupo de microorganismo que se desea

enriquecer siendo inapropiado para el crecimiento de otros microorganismos.

6.3.3. Medios enriquecidos: son medios de cultivo comunes de consistencia sólida con sustancias nutritivas extra como azúcares, sangre, vitaminas, suero. Su uso permite obtener una biomasa abundante, un crecimiento más rápido o favorecer el desarrollo de microorganismos que en medios comunes no se desarrollan (microorganismos exigentes). Ej. agar sangre, agar chocolate.

6.3.4. Medios selectivos: son medios con compuestos químicos (colorantes, antimicrobianos) que inhiben el crecimiento de un tipo de microorganismo impidiendo su desarrollo. Aquellos tipos de microorganismos que no se ven afectados por el inhibidor crecen sin inconvenientes. La selectividad también puede lograrse alterando las condiciones físicas del medio de cultivo, por ejemplo, cambiando el pH a valores distintos de 7 o aumentando la presión osmótica con cloruro de sodio o azúcares.

6.3.5. Medios diferenciales: en general contienen sustancias que cambian de color y permiten diferenciar distintos microorganismos en base a las características metabólicas particulares de cada uno. Los más utilizados son indicadores de pH (rojo fenol, azul de bromotimol) que cambian de color según el medio se vuelva ácido o alcalino. Generalmente, son medios **empleados** en pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de microorganismos. Ej. TSI (Triple Sugar Iron), SIM (H_2S-Indol-Movilidad), Medio citrato de Simmons.

6.3.6. Medios selectivos y diferenciales (mixtos): incluye las características de los medios selectivos y diferenciales ya explicados. Permiten el crecimiento y la diferenciación de ciertos tipos de microorganismos, mientras que otros se inhiben por la presencia de sustancias específicas. Por ejemplo, el agar EMB (Eosin Methylene Blue) favorece y diferencia bacterias gram negativas e inhibe estafilococos y otras bacterias gram positivas. En cambio, el agar Manitol Salado permite el crecimiento y diferenciación de estafilococos e inhibe el desarrollo de bacterias gram negativas. Otro medio selectivo es el agar cetrimide que permite el aislamiento y la diferenciación de especies del género *Pseudomonas* (Ver fundamento de cada medio en la parte práctica).

BIBLIOGRAFÍA

Fraise, A. P., Maillard, J. Y., Sattar, S. S. (Eds.). (2013). Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization (5th Ed.). Oxford, United Kingdom, Blackwell: Publishing Ltd.

Horak, C., Zarankin, E., Torno, G., Cerra, H., Fernández, M. y Lagomarsino, M. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.

Instituto Nacional del Medicamento (INAME). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2003). *Farmacopea Argentina* (7ª Ed.). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de* los *Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2017). *Introducción a la Microbiología* (12ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Comprender el correcto funcionamiento y manejo del autoclave.
2) Conocer el funcionamiento de un equipo de filtración de laboratorio.
3) Preparar medios de cultivo y acondicionar material para su correcta esterilización.

PARTE PRÁCTICA

1. Esterilización

Se realizará de manera demostrativa la preparación de distintos materiales de vidrio para su esterilización en autoclave. Se explicará el manejo del autoclave y de los equipos de filtración de líquidos a escala de laboratorio.

2. Preparación de Medios de cultivo-Procedimiento

Precaución

Los medios de cultivo deshidratados son, en principio, riesgosos. Contienen sustancias peligrosas y tóxicas, como las sales biliares, azida, selenito, colorantes, etc. La inhalación del polvo durante el pesaje puede ser peligrosa y debe evitarse mediante el uso de mascarilla facial.

1) Calcular la cantidad de polvo que se debe pesar. Para ello, buscar en el envase del medio la cantidad necesaria de polvo (dicha cantidad suele estar expresada en g/L) y realizar el cálculo necesario para el volumen a preparar (valor que será proporcionado por el docente responsable).
2) *Pesada de los componentes*: utilizar para los medios una balanza con una precisión no mayor a ± 0,1 g. Para componentes selectivos, colorantes, antibióticos, entre otros, la balanza debe ser analítica con una precisión mínima de ± 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%.

3) *Disolución o rehidratación*: medir en una probeta el volumen total de agua destilado, agregar ⅓ en un envase adecuado (mamadera o Erlenmeyer), luego adicionar el polvo pesado, mezclar vigorosamente y agregar el volumen de agua restante. Este procedimiento evitará la formación de grumos.
4) *Medir y ajustar el pH*: verificar el pH a temperatura ambiente utilizando tiras de pH. En caso de ser necesario ajustar con NaOH o HCl 1M al valor recomendado para cada medio de cultivo.
5) *Fundir en caso de medio agarizado*: 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 deben ser calentados con agitación frecuente hasta fundir el mismo para asegurar una distribución uniforme en el medio. El sobrecalentamiento de los medios de cultivo puede afectar la composición, por ejemplo, en medios con un alto contenido de azúcar y peptonas se provocan reacciones de Maillard (caramelización) con la formación de sustancias inhibidoras del crecimiento y colores más oscuros. Una vez fundido el agar se obtiene una solución viscosa que fluye suavemente y que puede distribuirse antes de que se solidifique a tubos de ensayo o de hemólisis.
6) *Distribuir y esterilizar*: dependiendo de la forma en que vaya a ser utilizado, el procedimiento será diferente:

a) En tubo: ya sean caldo o medios sólidos fundidos, colocar 2,5 a 3 ml en tubos de hemólisis y 5 o 6 ml en tubos de ensayo. Tapar y esterilizar. En caso de requerir tubos de agar con pico de flauta, luego de la esterilización se dejan solidificar en posición inclinada.
b) En placas de Petri: luego de fundido el agar, dejar entibiar, tapar y esterilizar. Luego dejar enfriar a 55 - 60 °C para disminuir la condensación de humedad que ocurre si el medio está más caliente. A continuación, se vierten de 12 a 15 ml en placas de Petri previamente estériles, esta operación se realiza en la cercanía de la llama de un mechero para evitar la contaminación microbiana durante este procedimiento. Debido a la extensión del Trabajo Práctico este último paso será llevado a cabo por los docentes o el personal técnico responsable.

3. Composición, fundamento e interpretación de medios mixtos

3.1. Agar Eosina Azul de metileno (EMB) para aislar bacilos gram negativos

➔ Composición para 1000 ml de agua destilada

Componente	**Cantidad (g)**
Peptona	10,0
Lactosa	5,0

Componente	Cantidad (g)
Sacarosa	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Eosina	0,4
Azul de metileno	0,065
Agar	13,5

-pH final 7,2 ± 0,2-

➔ Fundamento

El medio se emplea para diferenciar enterobacterias capaces e incapaces de fermentar lactosa y/o sacarosa. Las bacterias que fermentan los azúcares producen ácidos y forman colonias de centro oscuro con periferia rosada, las que no fermentan son incoloras. Los colorantes eosina y azul de metileno inhiben bacterias gram positivas.

➔ Interpretación de los resultados

Microorganismo	Tipo de colonia
Escherichia coli	Colonias con centro negro azulado y brillo metálico verde
Proteus mirabilis	Incoloras

3.2. Agar Cetrimide para aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*

➔ Composición para 1000 ml de agua destilada

Componente	Cantidad (g)
Peptona de gelatina	10,0
Cloruro de Magnesio	5,0
Sulfato de Potasio	5,0
Cetrimide	2,0
Sales biliares	1,5
Glicerina	1,0 ml
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

-pH final 7,2 ± 0,2-

➔ Fundamento

El medio contiene cloruro de magnesio y sulfato de potasio que estimulan la formación de pigmentos piocianina (azul), pioverdina (fluorescente), piomelanina que permiten diferenciar a *P. aeruginosa.* Cetrimide es un detergente catiónico que inhibe las bacterias acompañantes.

➔ Interpretación de los resultados en agar Cetrimide

Microorganismo	**Tipo de colonia**
P. aeruginosa	colonias mucosas verde-azuladas que emiten fluorescencia bajo luz ultravioleta.

3.3. Agar Manitol Salado (MS) para aislamiento de *Staphylococcus* spp.

➔ Composición para 1000 ml de agua destilada

Componente	**Cantidad (g)**
Peptona	5,0
Extracto de carne	1,0
Tripteína	5,0
Manitol	10,0
Cloruro de sodio	75,5
Rojo de fenol	0,025
Agar	15,0

-pH final 7,4 ± 0,2-

➔ Fundamento

El medio diferencia estafilococos según su capacidad de fermentar manitol. Si lo fermentan generan ácidos y causan el cambio de color del indicador de pH a amarillo. Los estafilococos no fermentadores cambian el medio a fucsia (alcalino) debido a que consumen la fuente de nitrógeno (peptona). La alta concentración salina aumenta la presión osmótica e inhibe bacterias gram negativas.

➔ Interpretación de los resultados

Microorganismo	**Tipo de colonia**
Staphylococcus aureus	Amarillas rodeadas de una zona del mismo color.
estafilococos coagulasa negativa (Ej. *S. epidermidis*)	Fucsia, rodeadas de una zona del mismo color.

3.4. Agar Mac Conkey para aislamiento de bacilos gram negativos

➔ Composición para 1000 ml de agua destilada

Componente	**Cantidad (g)**
Peptona de carne	1,5
Peptona de gelatina	17,0
Tripteína	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

-pH final 7,1 ± 0,2-

➔ Fundamento

Se utiliza para aislar y diferenciar bacilos gram negativos. La diferenciación se debe a la fermentación de la lactosa, bacterias fermentadoras disminuyen el pH del medio causando la precipitación de las sales biliares en la colonia y el cambio de color del indicador de pH (rojo neutro) a rosa-rojizo. Las colonias de bacterias no fermentadoras se observan incoloras. Las sales biliares y el colorante cristal violeta inhiben bacterias gram positivas.

➔ Interpretación de los resultados del agar Mac Conkey

Microorganismo	**Tipo de colonia**
Escherichia coli	Colonias rosadas con precipitación de las sales biliares.
Proteus mirabilis	Incoloras, sin precipitación de las sales biliares.

3 Siembra, aislamiento y conservación de microorganismos

OBJETIVOS

1) Distinguir las diferentes técnicas asépticas empleadas en la transferencia y aislamiento de microorganismos en medios de cultivo líquidos y sólidos.
2) Adquirir nociones básicas sobre métodos de conservación microbiana.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Crecimiento en cultivo. Conceptos de siembra, aislamiento y repique

Los microorganismos habitan diversas partes de nuestro cuerpo (cavidad oral, tracto gastrointestinal o la piel) y el medio ambiente (aire, suelo y agua). Una muestra de la cavidad oral del hombre puede contener billones de bacterias/ml constituida por muchas especies distintas. Dado que los microorganismos se encuentran en la naturaleza como poblaciones heterogéneas, el estudio de un determinado microorganismo requiere de **crecimiento en cultivo** que se logra en el laboratorio mediante la utilización de los medios de cultivo estériles y condiciones ambientales adecuadas.

El primer paso en el cultivo de microorganismos consiste en realizar una **siembra,** que se define como al acto de transferir un microorganismo desde su hábitat natural o nicho ecológico a un medio de cultivo adecuado. El medio será estéril y elegido de acuerdo a sus exigencias vitales para permitir el desarrollo y multiplicación si se lo coloca en condiciones ambientales acordes (temperatura, requerimiento de O_2, tiempo, entre otros). Las siembras pueden efectuarse a partir de muestras ambientales (tierra, aire, agua), alimentos, materiales biológicos (esputo, orina, muestra nasofaríngea), fármacos, cosméticos, superficies, (paredes, mesadas), entre otros.

Luego del periodo de incubación a temperatura adecuada, las poblaciones microbianas que se obtienen en el medio son denominadas **cultivos** y podrán dividirse en:

- ➔ **Cultivos mixtos:** si están constituidos por varias especies.
- ➔ **Cultivos puros:** contienen una única especie que deriva de una única célula. Esta es una condición artificial impuesta en el laboratorio que se lleva a cabo mediante la operación de aislamiento que se explicará más adelante.

Para obtener un cultivo puro es necesaria otra operación conocida como **aislamiento,** que se explica con detalle en el apartado 4. Una vez obtenido el cultivo puro de un único tipo de microorganismo, es necesario transferir un **inóculo** (porción de material celular proveniente de una colonia, biomasa o suspensión líquida) y realizar un **repique o trasplante**, es decir, transferirlo desde un medio de cultivo a uno nuevo. El objetivo del repique es renovar el medio

de cultivo para perpetuar la especie (conservación por subcultivo) o conocer alguna de sus características culturales, fisiológicas o metabólicas que se describen en el siguiente TPL.

2. Técnica aséptica para transferencia de microorganismos

La **asepsia rigurosa** al efectuar siembras, repiques y aislamientos impide el desarrollo de microorganismos contaminantes que no pertenezcan a la muestra y el escape de especies patógenas desde los cultivos al medio ambiente. Es por ello que los medios de cultivo son previamente esterilizados y todo el instrumental empleado debe estar estéril también. Se define **técnica aséptica** al conjunto de precauciones especiales que deben tomarse para preservar la pureza del inóculo (microorganismos originales de una muestra en la siembra o el cultivo puro durante un repique). Dicha técnica debe realizarse al abrigo de las corrientes de aire (puertas y ventanas) y con movimientos pausados. **Es de suma importancia que todo el material esté perfectamente rotulado para evitar confusiones.**

2.1. Procedimiento general

1) El ansa de cultivo, debe calentarse al rojo sobre la llama (esterilización por calor seco) inmediatamente antes de hacer la transferencia (Figura 9a). Este calentamiento destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del ansa. Se mantiene el ansa hacia abajo, de manera casi vertical dentro de la llama para que la totalidad del filamento alcance la misma temperatura. Luego, se mantiene el ansa cerca de la llama unos segundos mientras se deja entibiar.
2) Durante la inoculación, se sostiene el tubo en la mano izquierda y se retira el tapón con el dedo meñique de la mano derecha sin soltar el ansa esterilizada (o a la inversa en caso de personas zurdas) (Figura 9b). **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 contaminaciones potenciales.
3) A continuación, flamear la boca del tubo ya destapado manteniéndolo lo más cerca posible de la horizontal (Figura 9c). 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.
4) Se introduce el ansa estéril ya enfriada para recolectar el inóculo y se retira, manteniendo manos e instrumental dentro del cono de aire estéril generado por la llama (Figura 9d).
5) Volver a flamear la boca del tubo con idéntico objetivo (Figura 9e).
6) Con el dedo meñique se coloca nuevamente el tapón (Figura 9f). Al realizar esta maniobra se debe tener cuidado de no alejarse del mechero, pero evitando que el ansa entre en contacto con la llama y se incinere el material.
7) Luego se transfiere el material a un nuevo medio de cultivo, ya sea en placa de Petri o en tubo (Figura 9g).

8) Finalmente, volver a esterilizar el ansa al rojo vivo para eliminar cualquier fuente de contaminación, antes de apoyar el ansa en la mesada (Figura 9h). **Precaución:** nunca apoye el ansa caliente sobre la manguera que proporciona gas al mechero.

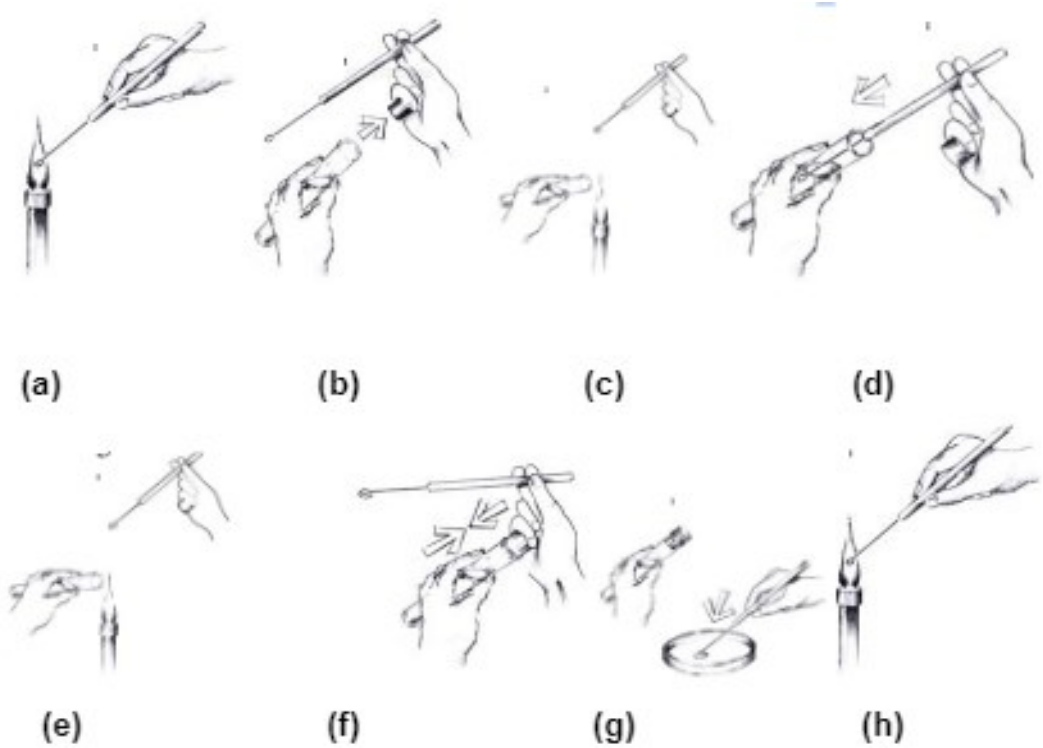


Figura 9. Pasos de la Técnica aséptica. Nota. Ilustraciones de Antonios T. Nota: Adaptado desde Petersen, Joan and McLaughlin, Susan, "Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen World Through Hands-On Investigation" (2016). CUNY Academic Works. Reproducida con permiso

La técnica en sí presenta variantes de procedimiento dependiendo del elemento (ansa, pipeta, espátula), tipo de medio (líquido, semisólido y sólido), recipiente (tubo, placa, frasco).

2.2. Procedimientos específicos de inoculación

Si bien los puntos desde (a) a (f) son comunes en la mayoría de los casos. La transferencia varía, según la consistencia del medio de cultivo, pudiendo utilizarse las siguientes técnicas:

2.2.1. Punción o picadura vertical en tubos con medio semisólido o blando

Luego de tomar el inóculo como se explicó previamente (pasos desde a hasta f), para el paso g se debe tomar el tubo que se va a sembrar, quitarle el tapón con el meñique de la mano opuesta, flamear la boca del tubo y con el ansa cargada de inóculo picar el medio hasta aproximarse al fondo del tubo. Retirar con cuidado el ansa, flamear la boca del tubo, tapar y esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesada. Rotular el tubo e incubar a temperatura adecuada durante el tiempo necesario.

2.2.2. Agotamiento por estrías en medios sólidos (en tubos o placas de Petri)

En estos casos el inóculo cargado en un ansa en anillo o en un hisopo se estría en forma de zigzag a intervalos de pocos milímetros sin superponer estrías. El objetivo es diluir progresivamente o "agotar" el inóculo.

- ➔ *Tubo con medio inclinado (pico de flauta):* introducir el ansa o el hisopo cargado en el tubo a inocular y trazar las estrías desde el fondo del pico de flauta hacia adelante. Rotular el tubo como se indicó con anterioridad y llevarlo a incubar.
- ➔ *Agar en placa de Petri:* tomar una placa de Petri que contiene el medio de cultivo ya solidificado y dividir la base con marcador indeleble del lado externo en 4 sectores y enumerarlos. Luego, levantar la base de la placa y trazar las estrías en cada cuadrante en orden sucesivo del sector 1 al 4 (Figura 10). Rotular la placa en un pequeño borde de la base e incubar en posición invertida (tapa hacia abajo y base hacia arriba), para evitar que el agua de condensación que se forma en la tapa humedezca el cultivo. Se recuerda que este es el método de elección para obtener colonias aisladas y lograr un cultivo puro.

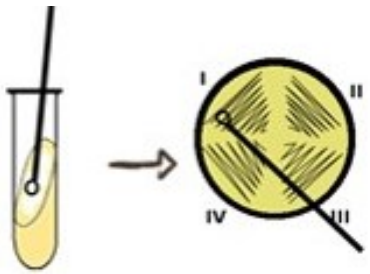


Figura 10. Aislamiento por agotamiento en placas de Petri. Nota: imagen creada por Mg. Verónica Gómez. Licencia CC-BY-SA.

2.2.3. Siembra o inoculación en profundidad por placa vertida

Consiste en colocar el inóculo líquido con una pipeta (o micropipeta) en una placa de Petri vacía (colocada con la base hacia arriba) y luego adicionar el medio de cultivo fundido y entibiado (45-50 °C). Para una distribución homogénea de los microorganismos, se realizan movimientos rotatorios una vez colocado el agar en la placa (Figura 11). Una forma alternativa consiste en mezclar el inóculo con el agar tibio dentro de un tubo, luego se vierte la mezcla en la placa y se homogeniza.

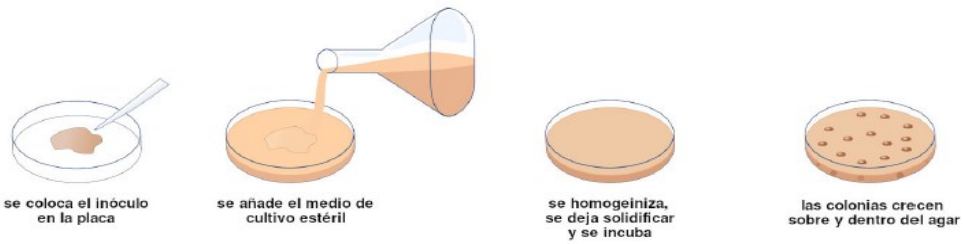


Figura 11. Siembra por placa vertida. Nota. Adaptado de Macedo. Wikimedia Commons. Licencia CC-BY-SA 4.0 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plating_methods.svg.

2.2.4. Inoculación o siembra en medios líquidos (caldos)

Los elementos a utilizar podrán ser ansas, micropipetas, pipetas o, cuya elección depende del volumen de inóculo que se debe agregar. En cualquier caso, el elemento debe introducirse en el tubo y descargar el inóculo. Tanto las pipetas como los tips que se emplean en las micropipetas se esterilizan por autoclave, previo a su uso. A las primeras se les coloca un tapón de algodón en la punta que protege a la propipeta del ingreso de líquido y se envuelven con papel poroso. Los tips se colocan en racks o frascos de vidrio que se envuelven o se tapan con papel poroso. Ambos elementos una vez utilizados al estar contaminados deben descartarse en un recipiente de descarte adecuado para tal fin.

3. Aislamiento

Consiste en obtener, a partir de un cultivo mixto, colonias lo más separadas posibles para conseguir cultivos puros. Se realiza siempre **en un medio sólido (de propósito general o selectivo) contenido en placas de Petri mediante el método por agotamiento en estrías o de placa vertida** (Ver procedimientos específicos). Cada célula se inmoviliza en el lugar en el que se encuentra, en lugar de "flotar" 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 macroscópicamente visible. Si el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja cantidad, se incluye un paso previo que consiste en sembrar la muestra en un medio de enriquecimiento apropiado, para luego efectuar el aislamiento.

4. Cultivo de bacterias anaerobias

El cultivo de bacterias anaerobias requiere medios libres de oxígeno, para ello se utilizan medios de cultivos reductores (medio Tioglicolato) y una incubación anaeróbica.

4.1. Dispositivos de incubación anaerobia

- **Cámaras anaerobias:** son cabinas que contienen guantes incorporados (similar a una cabina de seguridad biológica clase III) y que permiten sembrar, repicar e incubar microorganismos anaerobios en un ambiente lleno de una mezcla de N_2, CO_2 e H_2 y libre de oxígeno. El material ingresa a través de compuertas de seguridad automáticas que solo se abren cuando se ha logrado la atmósfera anaeróbica. También, cuenta con una estufa de incubación. La cámara junto a la estufa de incubación anaeróbica es útil cuando el volumen de tubos y placas a procesar es grande.
- **Jarras anaerobias:** el dispositivo consiste en un recipiente de acrílico resistente con una tapa hermética ajustable mediante una abrazadera de tornillo, que puede contener válvulas y un manómetro para controlar la sustitución del aire por un gas inerte, generando un ambiente anaeróbico. En ausencia de válvulas, se utilizan sobres comerciales y una bolsa con paladio como catalizador para crear anaerobiosis. Su mayor

desventaja es que, para examinar las placas, es necesario retirarlas del recipiente, exponiéndolas al aire. Se emplean indicadores de óxido-reducción, como tiras de azul de metileno o resazurina, para verificar la ausencia de oxígeno.

- ➔ **Bolsas anaerobias:** son bolsas de plástico transparente con capacidad para 1 o 2 placas y el sobre comercial para generar anaerobiosis y un indicador. El sobre se abre y la bolsa se sella inmediatamente. Después de la incubación, al igual que las jarras, las placas deben ser removidas para su procesamiento. Este sistema puede usarse para el transporte de muestras.

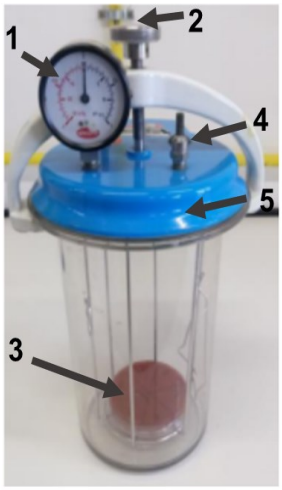


Figura 12. Jarra anaerobia. (1) Manómetro, (2) abrazadera a tornillo, (3) placas de Petri, (4) válvulas para reemplazo gaseoso, (5) tapa hermética. Nota. Imagen tomada por el Dr. Gabriel Salinas Ibáñez.

4.2. Sistemas para generar anaerobiosis

Para generar anaerobiosis en jarras o bolsas se utilizan sistemas que **remueven o reemplazan el oxígeno.** La **remoción del O_2** se logra:

- ➔ *Directamente:* El oxígeno se remueve mediante reacciones químicas con compuestos que son fácilmente oxidados por el mismo, por ejemplo, sulfato de cobre y pirogalol.
- ➔ *Indirectamente:* El oxígeno se transforma en agua mediante reacciones químicas mediadas por catalizadores que, además, generan CO_2 o H_2. Por ejemplo, el sistema comercial Gas Pak (BBL, OXOID, Biomerieux) consiste en un sobre donde ocurre una reacción química entre BH_4Na (borohidruro de sodio), ácido cítrico y $NaHCO_3$.

El **reemplazo** se logra introduciendo CO_2 o de una mezcla gaseosa (H_2, N_2, CO_2), repitiendo varias veces el procedimiento de vaciado y llenado sucesivo de la jarra de anaerobiosis.

Finalmente, una forma de eliminar oxígeno en tubos es utilizar la mezcla de vaselina sólida-parafina (VAS-PAR) que se utiliza como sellador en medios líquidos. El medio se hierve 10 minutos para eliminar el oxígeno. Se enfría en una mezcla de agua y hielo, se siembra y se

coloca la mezcla de VAS-PAR.

5. Conservación de cultivos bacterianos

Existe una amplia variedad de técnicas para la preservación de cultivos, cuyo objetivo es suprimir el crecimiento y la actividad metabólica celular asegurando la viabilidad y preservando el genotipo sin cambios evitando alteraciones genéticas (mutaciones) de una cepa particular. Esto permite facilitar la reproducibilidad de investigaciones y procesos industriales. La elección del método apropiado para un cultivo determinado dependerá del tipo de microorganismo, la necesidad de estabilidad de caracteres y/o sobrevida, la disponibilidad de equipamiento, mano de obra, apoyo financiero, el clima y la posibilidad de distribución y transporte.

5.1. Subcultivos o transferencias periódicas en medio fresco

Los cultivos se mantienen vivos en tubos con agar inclinado realizándose transferencias periódicas a un medio de cultivo recientemente preparado y estéril. Los medios a usar y el lapso de tiempo entre transferencias dependerá del tipo de microorganismo. Generalmente, los tubos se almacenan en la heladera con el objetivo de reducir el metabolismo celular, con este fin puede adicionarse aceite mineral que restringe el acceso al oxígeno.

➔ *Ventajas*

- ➢ Es sencillo, fácil de realizar.
- ➢ Es económico en comparación a otros sistemas de conservación.

➔ *Desventajas*

- ➢ A mayor número de pasajes o transferencias aumentan las probabilidades de cambios en las características del cultivo debido a mutaciones no deseadas. Por este motivo la Farmacopea Argentina tiene un límite de cinco pasajes para cepas de colección utilizadas en controles de calidad microbiológico.
- ➢ Fácil contaminación por microorganismos ambientales.
- ➢ Pérdida de la viabilidad cultivo.
- ➢ Alteraciones del medio de cultivo durante el almacenamiento en frío. Un claro ejemplo es la desecación que genera aumento de la presión osmótica y variación en la concentración de nutrientes. Este inconveniente puede impedirse usando aceite mineral y tapones a rosca.

5.2. Suspensión en agua destilada

Es útil para la conservación de microorganismos esporulados (*Bacillus y Clostridium*), algunas levaduras y bacterias no esporuladas que sobreviven en agua como *Pseudomonas aeruginosa*. Para el caso de las esporas, se conservan las esporas libres de células

vegetativas del siguiente modo:

1) Se preparan cultivos de 48 h en un medio que favorezca la formación de esporas, por ejemplo, el Mn es esencial para la esporulación de *Bacillus* spp.
2) Se resuspende la biomasa celular en agua bidestilada estéril conteniendo lisozima para lisar las células vegetativas.
3) Se incuba a 37 °C, 30 min para que actúe la enzima y se calienta a 80 °C por 10 min.
4) Se lavan las suspensiones 2 o 3 veces con agua bidestilada estéril y se centrifuga para eliminar los restos de biomasa que contienen las células vegetativas muertas.
5) Se almacenan alícuotas de la suspensión de esporas así obtenida en varios viales y se almacenan en el freezer a -20 °C por largos períodos de tiempo (varios años) o a 4 °C para el trabajo diario.

Para levaduras y *P. aeruginosa* no es necesario el tratamiento enzimático y sólo se suspende la biomasa en el agua estéril.

5.3. Crioconservación

Implica congelar y almacenar suspensiones celulares, a temperaturas que varían de -70 °C a -200 °C.

1) Se cultivan los microorganismos en caldo en condiciones óptimas hasta llegar a la fase exponencial media o tardía. Esto quiere decir que el microorganismo ha dejado de multiplicarse porque uno de los nutrientes fue totalmente consumido.
2) Se centrifuga para sedimentar la biomasa.
3) Se adiciona medio de cultivo recientemente preparado, ajustando la concentración celular en el orden de 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml).
4) Luego se fracciona la suspensión ajustada en criotubos estériles de polipropileno con tapa de cierre hermético o ampollas. Estos viales contienen sustancias crioprotectores como glicerol o DMSO. Estas son sustancias no tóxicas que ingresan a la célula, uniéndose a los electrolitos que aumentan en concentración durante el congelamiento o a las moléculas de agua para retrasar el congelado.
5) Se debe verificar el cerrado hermético para evitar la potencial explosión de las mismas al pasar del nitrógeno líquido a la temperatura ambiente para recuperar los cultivos.
6) Los criotubos se congelan primero 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 (-140 °C).
7) 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.

Otra opción un poco más económica es utilizar un freezer de -80 °C, es importante que el

descongelamiento sea rápido y el recongelamiento lento para no afectar la viabilidad de los microorganismos a conservar. Ambos procedimientos previenen la formación de cristales e impiden el daño celular.

➔ *Ventajas*

Con este sistema el período de conservación puede ser indefinido, con una retención de hasta 95 % de viabilidad. Esto se debe a que a temperaturas menores de -139 °C toda el agua interna de la célula se congela deteniéndose el metabolismo celular. Sin embargo, 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.

➔ *Desventajas*

- ➢ Alto costo.
- ➢ Riesgo de pérdidas de nitrógeno que 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 que pueden retirarse individualmente sin necesidad de descongelar todo el vial).

5.4. Liofilización

Es un proceso que involucra el congelamiento de un cultivo microbiano, seguido por un secado bajo presión reducida (vacío) para remover el agua de la suspensión celular congelada por sublimación (del estado sólido al gaseoso). Es el método indicado para preservar la viabilidad de microorganismos por largo tiempo con precauciones mínimas de almacenamiento y/o transporte.

➔ *Procedimiento*

1) Las suspensiones microbianas se colocan en ampollas de liofilización y se congelan siendo sumergidas en un baño de hielo seco y etilenglicol 50% a -40 °C.
2) Las ampollas se conectan en las bocas de entrada de las válvulas de distribución y se enciende una bomba de vacío para producir la sublimación del agua. El vapor de agua será condensado por una trampa de humedad a baja temperatura. El porcentaje de humedad residual debe oscilar en 1 %, ya que porcentajes menores podrían provocar muerte celular o mutaciones por daño al ADN.
3) Una vez completada la liofilización se sellan las ampollas in situ para proteger el material secado del aire que favorece su deterioro.

➔ *Ventajas*

➢ Se puede trabajar con un número grande de muestras al mismo tiempo, como en el caso del empleo en la preparación de vacunas.

➢ No se requiere almacenamiento en frío.

➔ *Factores que influyen en la viabilidad*

1) 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.
2) Concentración celular: la sobrevida es directamente proporcional al título inicial de células, es recomendable una suspensión de células a liofilizar relativamente densa a mayor concentración, más probabilidad de recuperar células viables.
3) Edad fisiológica: las células en fase estacionaria de crecimiento son más resistentes.
4) Medio de suspensión del cultivo a liofilizar: generalmente contiene altos niveles de suero, proteínas, aminoácidos, carbohidratos o leche descremada.
5) 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.
6) Vacío en los frascos: es importante porque de lo contrario la presencia de oxígeno en organismos secos es tóxica.

BIBLIOGRAFÍA

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

McNeil, B., & Harvey, L. (Eds.). (2008). *Practical fermentation technology*. Reino Unido. John Wiley & Sons.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2017). *Introducción a la Microbiología* (12ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Adquirir destreza en el manejo de técnicas asépticas para realizar siembras y repique en medios de cultivos líquidos y sólidos.
2) Aislar microorganismos en medios de cultivo mixto (diferencial y selectivo) para obtener cultivos puros o axénicos.
3) Discutir las diferentes aplicaciones de cada sistema de conservación de microorganismos.

PARTE PRÁCTICA

1. Siembra en placa con medio sólido

1.1. Agotamiento con hisopo de la microbiota de la mano

1) Retirar el hisopo estéril del tubo que lo contiene.
2) Introducir el hisopo en un tubo con solución salina estéril y remojar. Comprimir sobre las paredes internas para retirar el exceso de líquido.
3) Tomar la muestra de toda la superficie de la mano incluyendo espacios interdigitales.
4) Sembrar en una placa de Petri con agar nutritivo.
5) Rotular e incubar boca abajo (placa invertida) 24 horas a 37 °C.

1.2. Placa vertida de una suspensión de tierra

1) Transferir 1 ml de una suspensión de tierra a una placa de Petri estéril.
2) Volcar en una placa de Petri estéril el tubo con agar nutritivo mantenido a 45 °C.
3) Agitar con un movimiento rotatorio en forma de ocho hasta asegurar una buena distribución como en la Figura 11.
4) Rotular e incubar boca abajo (placa invertida) 24 horas a 37 °C.

2. Repique

2.1. En medio líquido (caldo nutritivo)

1) Utilizar la cepa entregada por el docente para obtener inóculo con un ansa en anillo mediante la técnica aséptica.
2) Resuspender el inóculo en el caldo nutritivo.
3) Rotular e incubar el tubo 24 horas a 37 °C.

2.2. En medio sólido por agotamiento en tubo

Inocular una bacteria en agar nutritivo inclinado (ANI) y una levadura en agar Sabouraud inclinado (AS).

1) Utilizar las cepas entregadas por el docente para obtener inóculo con un ansa en anillo mediante la técnica aséptica.
2) Estriar el inóculo desde el fondo del pico de flauta hacia la superficie.
3) Rotular e incubar el tubo 24 horas a 37 °C.

3. Aislamiento por agotamiento en medio mixto (EMB, MS o Agar cetrimide)

1) Marcar en la base de la Placa 4 cuadrantes y enumerarlos. Posicionar la placa con la tapa hacia abajo.
2) Esterilizar al rojo vivo el ansa en anillo.

3) Obtener inóculo (a partir de las cepas entregadas por el profesor) destapando el tubo y flameando la boca del mismo.
4) Abrir la placa con cuidado y apoyar el ansa sobre la superficie del agar y estriar cuatro cuadrantes para agotar el material como en la Figura 10. Flamear y cerrar el tubo.
5) Esterilizar el ansa nuevamente.
6) Rotular e incubar el tubo 24 horas a 37 °C.

4 Características culturales del crecimiento Identificación fenotípica

OBJETIVOS

1) Diferenciar las características macroscópicas de los microorganismos.
2) Reconocer la morfología celular a través del microscopio.
3) Comprender el fundamento de algunas pruebas bioquímicas utilizadas en identificación fenotípica.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Características fenotípicas microbianas

Un requisito indispensable para clasificar e identificar diferentes especies de microorganismos implica un completo conocimiento de las características fenotípicas para establecer diferencias y similitudes entre diversos grupos. Estás características externas son el resultado visible de la manifestación del genotipo y su interacción con el medio ambiente (Figura 13).

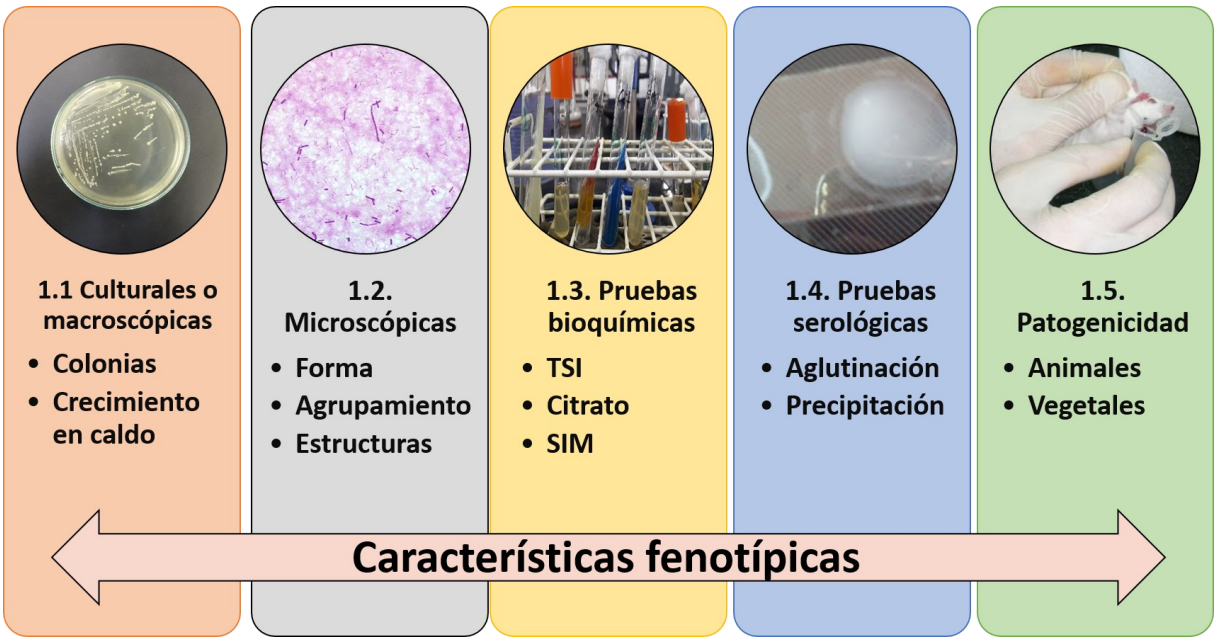


Figura 13. Clasificación de las características utilizadas en identificación fenotípica. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

1.1. Características culturales o macroscópicas

Comúnmente se observa **a simple vista** el crecimiento en medio agarizado o líquido.

1.1.1. Crecimiento en medio agarizado

Cuando se desarrollan colonias aisladas en placa de agar las principales características a observar son la forma, tamaño, margen y elevación de las colonias (Figura 14). Asimismo, se observa la pigmentación (amarillas, naranjas, negras), consistencia (butirosa, cremosa, serosa) y características ópticas (opacas, translúcidas u opalescentes). Cuando se observa el crecimiento en un tubo, la biomasa formada podrá ser escasa, moderada o abundante.

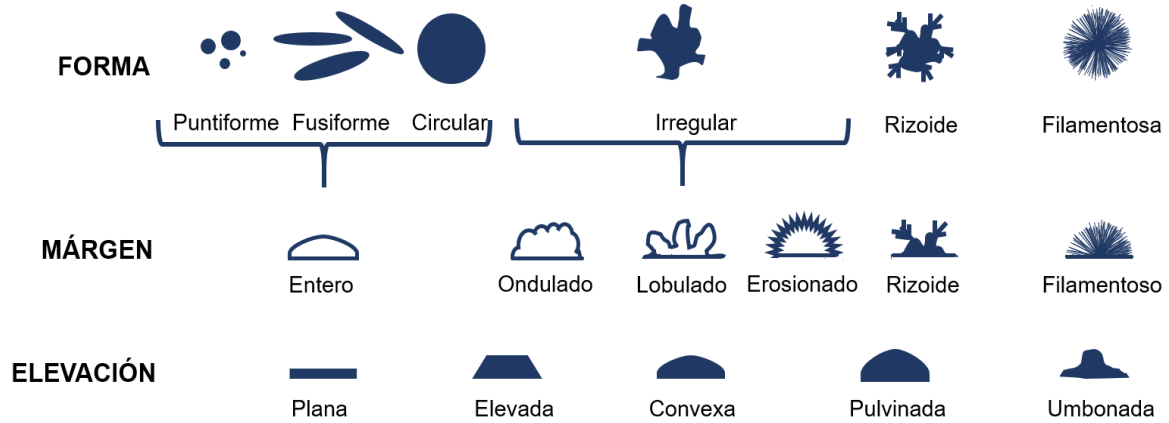


Figura 14. Principales características macromorfológicas de las colonias. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

1.1.2. Crecimiento en caldo nutritivo

Se puede observar una turbidez escasa, moderada o abundante que podrá estar distribuida en forma uniforme o sedimentada en el fondo. En ciertos casos las células se agrupan formando agregados o flóculos, también se pueden formar biopelículas que se adhieren a la superficie del vidrio.

1.2. Características microscópicas

Este tipo de características se observan realizando preparados en portaobjetos que son observados **en el microscopio,** en fresco o en preparaciones previamente coloreadas como se describe a continuación. Así, pueden observarse **las células microbianas**, que, en el caso particular de las bacterias, tienen tamaños y formas muy variables. La mayoría mide entre 0,2 y 1 µm de diámetro, y entre 2 y 8 µm de largo. Podrán ser esféricas (cocos), bastones (bacilos) o en espiral (espiraladas) y podrán formar agrupaciones de células (Figura 15).

1.2.1. Observación microscópica en fresco

El procedimiento consiste en colocar una gota de cultivo líquido o suspender el microorganismo en una gota de solución fisiológica con un ansa, en el centro de un portaobjetos. **Cubrir con un cubreobjetos** y observar utilizando el objetivo 40X. Podrán

realizarse sin teñir o teñidos con colorantes diluidos como se describe en la coloración vital. Además de observar la morfología celular, permite evaluar la movilidad del microorganismo, observando si las bacterias presentan verdadero movimiento, diferenciándolo del browniano.

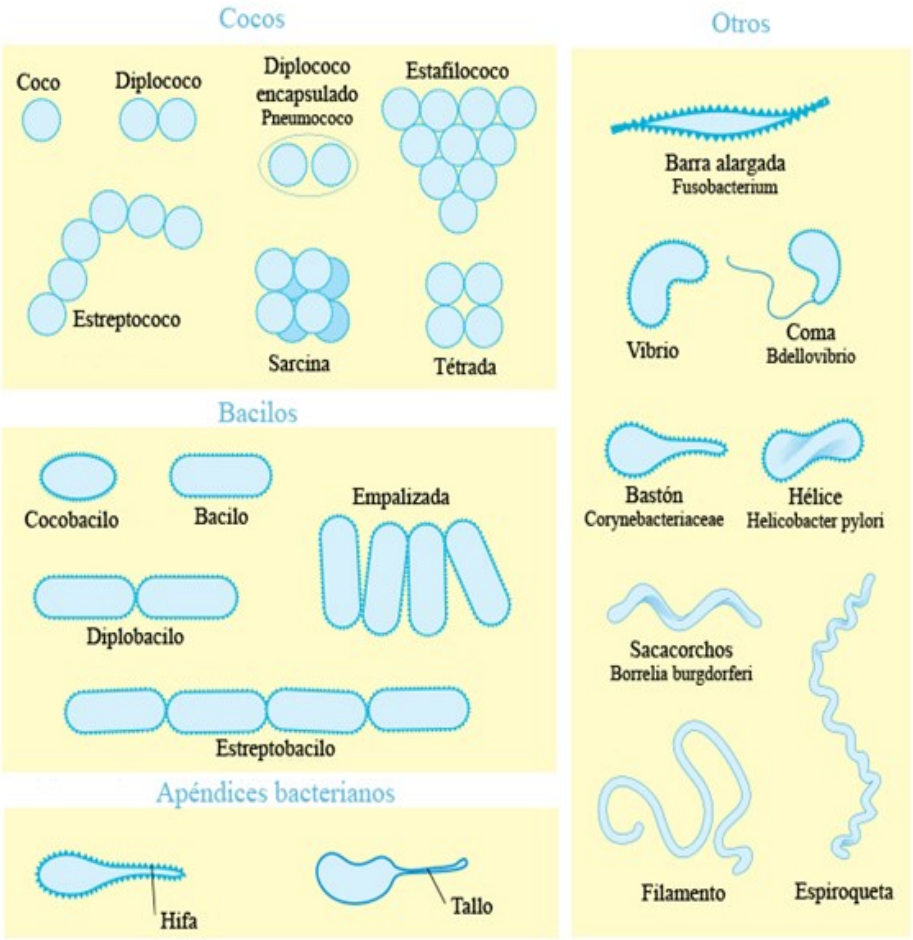


Figura 15. Forma y agrupaciones de las bacterias. Nota: Imagen de dominio público. Wikimedia Commons.

1.2.2. Observación en preparaciones fijadas y coloreadas

Los microorganismos son químicamente muy diferentes del medio que los rodea. Esta diferencia permite distinguir las bacterias utilizando diversos tipos de coloraciones habilitando la observación con mayor aumento mediante el empleo del objetivo de inmersión del microscopio (100X). **En estos casos no se utiliza cubreobjetos.** 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 (cocos, bacilos, entre otros).
- ➔ Las tinciones específicas permiten el estudio de otras estructuras como las esporas y cápsula de la célula bacteriana.

1.2.3. Preparación de un frotis

Antes de colorear generalmente se prepara un frotis del siguiente modo (Figura 16):

1) Frotis: se realiza colocando una ansada de cultivo líquido en el centro de un portaobjeto. 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 el inóculo, de manera de lograr una película delgada y uniforme.
2) Secado: permite evaporar el exceso de humedad y puede realizar a temperatura ambiente (lento) o bien manteniéndolo encima de la llama del mechero hasta sequedad total (rápido).
3) Fijación: El propósito de la fijación es matar a los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y que se adhiera al portaobjetos para no “lavar” las células durante el proceso de tinción. El agente fijador podrá ser físico (calor del mechero) o químico (alcohol). El procedimiento más frecuente es tomar desde un extremo el portaobjeto (con las células siempre hacia arriba) y se lo pasa tres veces rápidamente por la llama del mechero. Luego de que se enfríe se colorea.
4) Coloración: se realizará mediante alguno de los métodos que se describen a continuación.

1.2.4. Tipos de colorantes

Generalmente son sales en las que uno de sus iones tiene color. Si el color reside en el **ion positivo** será **básico**, mientras que si se encuentra el color en el **ion negativo** será **ácido**. Por ejemplo, azul de metileno presenta el catión coloreado por lo que es básico.

$$\mathbf{Cl\ AM \rightarrow Cl^- + AM^+}$$

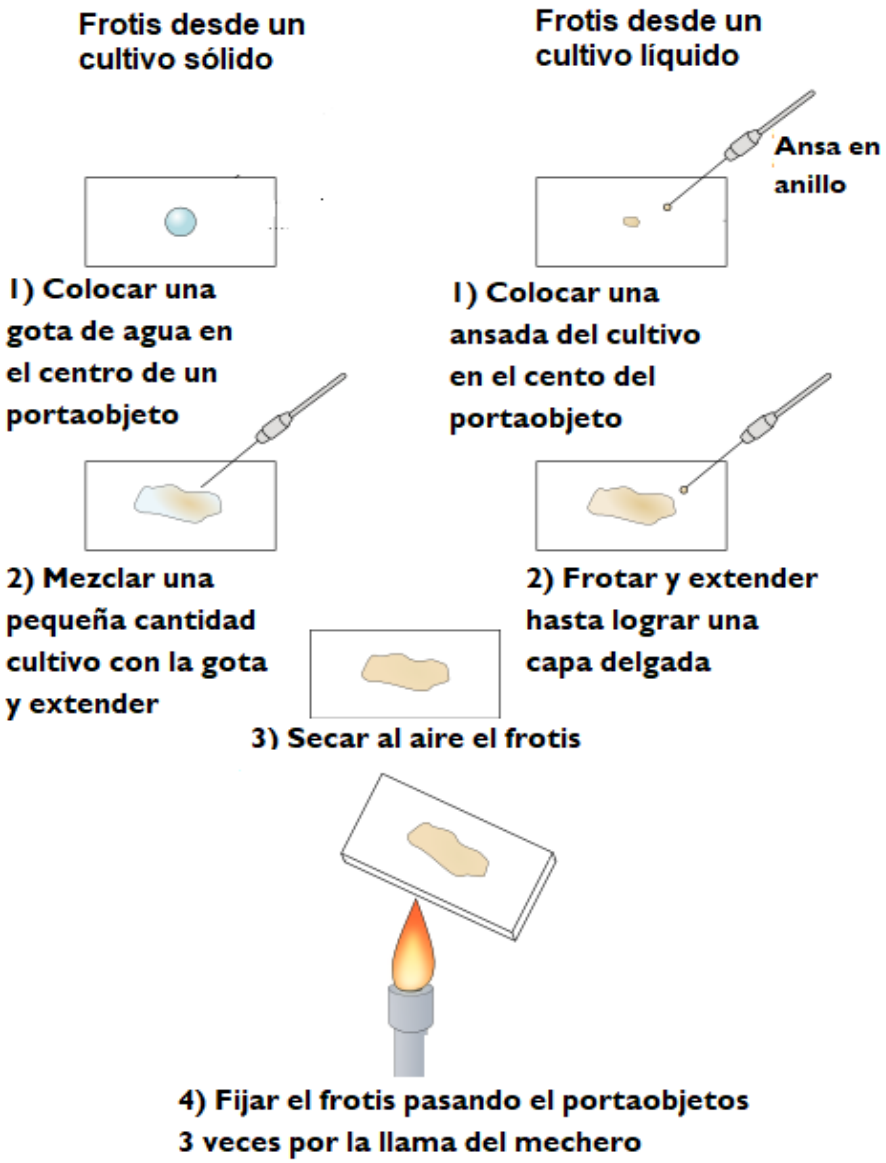


Figura 16. Preparación del frotis para colorear. Nota: Imagen de dominio público. Wikimedia Commons.

1.2.5. Mecanismos de coloración

1) **Coloración simple o 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 ejemplo, el ion azul de metileno), de este modo la bacteria adquiere color. 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. Un caso especial es la **coloración vital**, que se realiza en preparaciones húmedas utilizando un colorante en

soluciones muy diluidas, de modo que no afecte la vitalidad del microorganismo, permitiendo visualizar sus estructuras y movimiento.

2) **Coloración indirecta:** Como la capacidad del colorante reside en el ion cargado negativamente, este no tendrá afinidad por la célula bacteriana negativa también. En lugar de ello, el colorante se deposita alrededor de la célula, quedando ésta incolora y el medio que la rodea coloreado. Un ejemplo es la eosina. Otro ejemplo es la tinción negativa con tinta china que en clínica se utiliza para visualizar la cápsula del hongo *Cryptococcus neoformans* (agente causal de la criptococosis). Dado que la tinta no puede ingresar se visualizan las células sin colorear en contraste con un fondo negro oscuro y homogéneo.
3) **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. La coloración diferencial más difundida en microbiología es la coloración de Gram. Otro tipo de coloración diferencial permite distinguir esporas.

1.2.6. Coloración diferencial de Gram Fundamento, procedimiento e interpretación

Se emplean 2 colorantes básicos, un mordiente y un decolorante que se adicionan del siguiente modo (Figura 17):

- ➔ **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, en las bacterias gram negativas.
- ➔ **Contraste (fucsina 1/10):** es un colorante de color distinto al colorante inicial y permite el contraste de las células decoloradas con un color diferente al de las células que no se han decolorado.

La coloración diferencial introducida por Christian Gram en 1884 divide a las bacterias en dos grupos en base a las diferencias de composición de su pared celular:

- **Gram positivas (violetas):** son bacterias que contienen una capa gruesa de peptidoglicano (representa el 90% de la pared) y además contiene ácidos lipoteicoicos y teicoicos. Durante la etapa de decoloración esta pared se vuelve más impermeable y retiene el complejo cristal violeta-lugol.
- **Gram negativas (rojas-fucsias):** la pared celular de estas bacterias está compuesta por una fina capa de peptidoglicano (representa sólo 10% de la pared) y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. El alcohol reduce la permeabilidad permitiendo que el cristal violeta salga de la célula, finalmente adquieren la tonalidad del

segundo colorante.

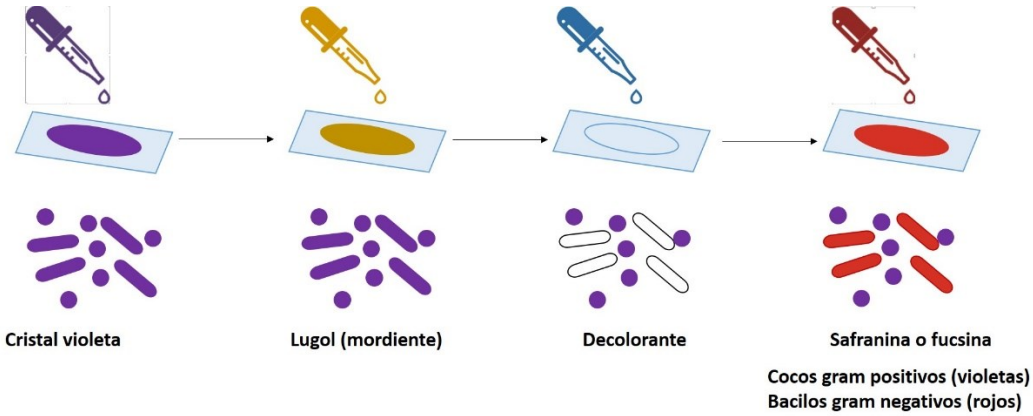


Figura 17. Procedimiento y resultado de la coloración de Gram. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

1.3. Pruebas bioquímicas

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 que refleja la composición enzimática del microorganismo y nos ayuda en la identificación y diferenciación de un microorganismo, entre otras especies estrechamente relacionadas. Para determinar qué pruebas deben realizarse el primer paso es establecer la forma celular y su clasificación por tinción de Gram.

1.3.1. Bacterias gram-negativas

Nos enfocaremos principalmente en algunas pruebas empleadas comúnmente en la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Un conjunto de pruebas usado frecuentemente recibe el nombre de **IMViC:**

I Prueba del Indol

M Prueba de Rojo de Metilo

Vi Prueba de Voges-Proskauer

C Prueba de utilización de Citrato

Pruebas bioquímicas en medio SIM (Sulfuro de hidrógeno, Indol, Movilidad)

Este medio semisólido se inocula por punción vertical y luego de la incubación permite evaluar tres características de los microorganismos (Tabla 4):

1) **Producción de indol:** Aquellos microorganismos que poseen la enzima triptofanasa son capaces de oxidar el aminoácido triptófano (presente en la tripteína del medio) para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamado triptofanasa. Este metabolito se puede detectar mediante la adición del reactivo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehído) que reacciona con indol para dar un anillo rosado en la superficie del tubo, en este caso la reacción será positiva (por ejemplo, *E. coli)*.

2) **Producción de sulfuro de hidrógeno:** cuando la prueba es positiva, el tiosulfato de sodio en este medio es reducido para dar H_2S en forma de gas. El gas reacciona con una sal de hierro (III) para dar un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso (FeS).
3) **Prueba de movilidad:** muchos microorganismos poseen flagelos, que son responsables de su movilidad. Esta característica se pone de manifiesto cuando se forma abundante turbidez alrededor de la punción.

Tabla 4. Interpretación de los resultados en el medio SIM.

Característica	Resultado e Interpretación
Movilidad	**positivo:** el medio se vuelve turbio (*E. coli, P. mirabilis*).
	negativo: solo hay turbidez en la cercanía de la línea de punción (*Klebsiella pneumoniae*).
H_2S	**positivo:** ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de siembra (*P. mirabilis*).
	negativo: sin cambio de color (*E. coli*).
Indol	**positivo:** al ser reveladas con Kovacs se forma anillo rojo en la superficie (*E. coli*).
	negativo: Sin cambio de color (*P. mirabilis y P. aeruginosa*).

Prueba de utilización del citrato. Medio citrato de Simmons

Es un medio de cultivo diferencial que permite el reconocimiento de microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Aquellas bacterias que poseen citrato permeasa desdobla el citrato dando carbonatos y bicarbonatos alcalinos como productos finales. Estos productos provocan el viraje del azul de bromotimol de verde a azul considerándose positiva la reacción.

Agar triple-azúcar-hierro (T.S.I: Triple-Sugar-Iron)

Este medio permite investigar las siguientes tres características:

1) **Fermentación de azúcares:** los microorganismos podrán fermentar 1, 2 o 3 hidratos de carbono (glucosa, sacarosa y/o lactosa) que posee el medio TSI y producir ácidos a partir de ellos, en este caso la reacción será positiva y se observará en el tubo como un cambio del rojo fenol de color rojizo (neutro-alcalino) al amarillo (ácido). Esto ocurre en dos sectores diferenciados en el tubo: profundidad (fondo) y superficie (pico de flauta). De este modo surgen tres posibilidades:

➔ *Si fermenta sólo glucosa:* (*Proteus mirabilis*)

A. pico de flauta (superficie): reacción alcalina (color rojo).
B. profundidad (fondo): amarillo (reacción ácida).

➔ *Si fermenta glucosa, sacarosa y/o lactosa* (*Escherichia coli*)

A. pico de flauta: amarillo.

B. profundidad: amarillo.

➔ *No fermenta ningún azúcar* (*Pseudomonas aeruginosa*): el medio no cambia de color o se torna más rojizo o fucsia porque el microorganismo consume la peptona formando productos básicos en lugar de ácidos.

2) Generación de gas

➔ *Microorganismo aerogénico* (*E. coli*): hay producción de CO_2 e H_2 y se observan burbujas en el medio de cultivo, roturas y/o desplazamiento del mismo.

➔ *Microorganismo anaerogénico* (*P. mirabilis*): no se observan burbujas de gas.

3) Producción de sulfuro de hidrógeno

➔ Reacción *positiva (P. mirabilis):* ocurre en dos pasos, primero las bacterias que contengan la enzima tiosulfato reductasa son capaces de reducir el tiosulfato de sodio y producirán el gas H_2S. Para que esto ocurra el medio debe tener bajo pH ácido (con protones disponibles), por lo que la bacteria también debe fermentar alguno de los tres azúcares. En el segundo paso H_2S reacciona con una sal de hierro para formar un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. Si el precipitado es abundante puede enmascarar la acidez en profundidad, sin embargo, dado que el precipitado requiere un medio ácido se asume que el microorganismo fermenta glucosa.

➔ *Reacción negativa (E. coli):* no se observa precipitado negro.

Tabla 5. Interpretación de los resultados en TSI.

Microorganismo	**Fondo**	**Superficie**	**H_2S**
Enterobacter aerogenes	AG	A	-
E. coli	AG	A	-
Proteus vulgaris	AG	A	+
Salmonella typhimurium	A	K	+
Salmonella enteritidis	AG	K	+
P. aeruginosa	K	K	-

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

1.3.2. Cocos gram-positivos

Prueba de la catalasa

➔ *Fundamento*

La enzima catalasa se encuentra en numerosas bacterias aerobias y facultativas (excepto *Streptococcus* que no la poseen), pero no está presente en anaerobios. Esta enzima cataliza la ruptura del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con liberación de oxígeno.

➔ *Procedimiento-Método del portaobjetos*

1) Con el ansa en anillo recoger el centro de una colonia pura de 18 - 24 h y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
2) Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 al 3 % sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
3) Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
4) Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
5) Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

➔ *Interpretación de los resultados:*

A. *-Reacción positiva:* hay burbujas.
B. *-Reacción negativa:* sin burbujas.

➔ *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.

2. Aplicaciones de la identificación fenotípica

El principal propósito de todo esquema de clasificación microbiano es la identificación a nivel de especie, la separación y reconocimiento exacto de subtipos dentro de una especie. Esta clasificación es clave en medicina, en las industrias farmacéutica, alimenticia y la investigación ambiental.

En la microbiología clínica, la aplicación rutinaria de técnicas fenotípicas permite identificar la especie de los agentes patógenos responsables de un proceso infeccioso para aplicar una terapia antimicrobiana eficaz.

La industria farmacéutica y alimentaria requieren la identificación fenotípica cuando se detecta contaminación microbiana. En los medicamentos existen microorganismos específicos que deben estar ausentes (*E. coli, Salmonella* spp., *P. aeruginosa, S. aureus,* complejo *Burkholderia cepacia*) y en caso de confirmarse su presencia la formulación no cumplirá con los controles de calidad microbiológicos. En tanto que en alimentos los contaminantes habituales son enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa, S. aureus*.

3. Manual Bergey-ABIS online

El sistema de clasificación de microorganismos más aceptado es el Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology (Manual de bacteriología sistemática de Bergey), publicado por una organización sin fines de lucro. Su segunda edición consta de 5 volúmenes que pueden actualizarse por separado para asistir a la identificación microbiana e indicar las relaciones filogenéticas que existen entre las distintas clases de bacterias. Existen softwares libres y comerciales que se basan en la información del manual. Uno de esos software de libre acceso se llama ABIS online bacterial identification software, cuyo esquema de identificación permite comparar entre los valores de los caracteres morfológicos y bioquímicos de la cepa aislada y los valores estándar de los taxones contenidos en la base de datos.

3.1. Sistemas comerciales multipruebas

Consiste en realizar varias pruebas bioquímicas en simultáneo mediante sistemas de inoculación manual o automatizada. Los sistemas exigen condiciones precisas de inóculo, modo de inoculación, incubación y lectura que, de no seguirse, pueden dar lugar a errores. Los resultados obtenidos son analizados con software informáticos que indican porcentaje de similitud de la cepa estudiada con la base de datos del software utilizado.

3.2. Manuales

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Un ejemplo es el sistema API (Biomerieux).

3.3. Automatizados

Son equipos cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles o tarjetas con pequeños pocillos que contienen los sustratos de cada prueba bioquímica. El conjunto de pruebas de un panel depende del tipo de microorganismo que se desea identificar. Los datos obtenidos son analizados y proporcionan un índice de fiabilidad para la identificación del microorganismo. Ejemplos: MicroScan, Vitek.

BIBLIOGRAFÍA

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

McFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.

Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación

bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. SEIMC.

Sorescu, I., & Stoica, C. (2021). Online advanced bacterial identification software, an original tool for phenotypic bacterial identification. Romanian Biotechnological Letters, 26(6), 3047-53. ABIS-Online

Whitman, W. B. (Ed). (2015). *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. New Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Bergey's Manual Trust.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Observar el crecimiento macroscópico y por microscopía con coloraciones.
2) Determinar el tipo de metabolismo microbiano mediante pruebas bioquímicas.
3) Comprender el manejo de Manual Bergey 's.

PARTE PRÁCTICA

1. Características culturales del crecimiento

Observar las colonias desarrolladas en las siembras del trabajo práctico anterior, según lo expuesto en apartado 1.1.

2. Características microscópicas

Elegir una de las colonias de dicha placa y colorear con Gram.

➔ *Procedimiento*

1) Hacer el frotis.
2) Secar en la parte alta de la llama.
3) Fijar pasando el portaobjetos tres veces por el centro de la llama.
4) Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar 2 minutos.
5) Escurrir el colorante, lavar con agua corriente y tratar con lugol durante 1 min. Volcar.
6) Decolorar con alcohol o alcohol-acetona.
7) Lavar con agua corriente y efectuar la coloración de fondo con la fucsina 1/10. Dejar actuar 1 min.
8) Lavar. Secar. Observar por inmersión.
9) Las bacterias Gram positivas se observan violetas y las Gram negativas rojas.

3. Pruebas bioquímicas

Luego, a partir de la misma colonia, inocular una batería de pruebas bioquímicas (TSI, SIM, citrato) según lo indicado en el apartado correspondiente.

➔ *Inoculación e incubación*

Tocar con el ansa una colonia sospechosa de la superficie del agar para inocular las pruebas del siguiente modo:

1) **SIM**: por punción vertical con ansa recta, incubar a 33-37 °C, durante 18-24 horas.
2) **Citrato:** por estrías con ansa en anillo, incubar a 33-37 °C, durante 24-72 horas.
3) **TSI:** mixta, por punción y estrías, incubar a 33-37°C, durante 18 a 24 horas.

Una vez concluida la incubación interpretar las pruebas, en el caso de SIM agregar el reactivo de Kovacs para revelar la presencia de indol. Luego, identificar el microorganismo con la ayuda del Manual Bergey 's.

5 Identificación genotípica de microorganismos

OBJETIVOS

1) Comprender los diferentes métodos de secuenciación genómica para la identificación genotípica de microorganismos.
2) Conocer la aplicación de las distintas técnicas moleculares para la tipificación de microorganismos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Información genética. ADN y ARN

En los microorganismos la información genética se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (ADN), excepto en los virus, donde puede estar en el ADN o ácido ribonucleico (ARN). El ADN contiene el patrón genético de la célula, mientras que el ARN convierte este patrón en secuencias definidas de aminoácidos para formar proteínas. La unidad funcional de la información genética es el gen, localizado en el o los cromosomas, el conjunto de genes constituye el genoma. Asimismo, existen otros elementos genéticos que son extracromosómicos como los plásmidos que pueden llevar genes de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y otras características adaptativas.

Los ácidos nucleicos están compuestos por nucleótidos que contienen en su estructura:

1) una pentosa (ribosa en el ARN y desoxirribosa en el ADN).
2) una base nitrogenada: purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (timina, citosina y uracilo). La guanina, adenina y citosina están en ambos ácidos nucleicos, timina se encuentra solo en el ADN mientras que en el ARN está presente uracilo.
3) una molécula de fosfato.

El ADN en las células forma una doble hélice con dos cadenas de polinucleótidos complementarias, estabilizadas por puentes de hidrógeno: adenina se aparea con timina (doble enlace) y guanina con citosina (triple enlace), haciendo a los pares GC más fuertes que los AT, lo que contribuye a la estabilidad del ADN (Figura 18).

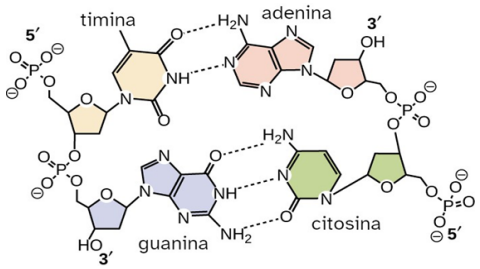


Figura 18. Apareamiento específico de nucleótidos mediante puentes de hidrógeno. Nota. Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

2. Transmisión de la información genética: replicación del ADN

Para transmitir información genética, la doble hélice del ADN se abre y cada cadena parental sirve como molde para sintetizar una nueva cadena complementaria en un proceso semiconservativo catalizado por la enzima ADN polimerasa. Las dos dobles hélices resultantes tienen una cadena nueva y una parental.

3. Síntesis de ARN y proteínas

La **transcripción** corresponde a la síntesis de ARN usando el ADN como molde y está catalizada por la enzima ARN-polimerasa. En tanto que, la **transducción** consiste en la síntesis proteica en la cual participan tres tipos de ARN: el ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosomal (ARNr). Sin embargo, algunas moléculas de ARN no se traducen para dar proteínas y se conocen como ARN no codificante (ARNnc). En este caso, el propio ARN puede regular la expresión génica, tanto a nivel de la transcripción como de la traducción. El ARN no codificante incluye, además de ARNt y ARNr, las moléculas de ARN pequeño nuclear (ARNsn) necesarias para el procesamiento del ARN, que ejercen su función por apareamiento de bases con otras moléculas de ARN, normalmente ARNm.

4. Identificación genotípica de microorganismos

Los métodos de tipificación de microorganismos se dividen en dos grandes grupos:

1) **Fenotípicos**, basados en características “observables” morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y metabólicas que requieren técnicas de cultivo en laboratorio. Estos métodos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos debido a que la expresión de un carácter fenotípico puede variar como resultado de la interacción del genotipo con el ambiente. Por lo tanto, no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas o una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos, dificultando la diferenciación de especies fenotípicamente similares.
2) **Genotípicos**, basados en el estudio del ADN empleando técnicas de biología molecular. Son métodos alternativos o complementarios rápidos en los que no siempre es necesario cultivar y aislar al microorganismo. La amplificación de genes específicos directamente desde muestras ambientales permite evaluar la biodiversidad de un hábitat, en tanto que en muestras clínicas son útiles en los estudios epidemiológicos para controlar enfermedades infecciosas.

En la década de 1980, comenzó la búsqueda de genes candidatos para establecer relaciones filogenéticas, en las bacterias se seleccionaron operones (familia de multigenes) que codifican las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos (marcadores housekeeping). Estos genes están distribuidos universalmente, son

funcionalmente constantes, siempre se expresan independientemente de las condiciones ambientales (constitutivos) y se mantienen estables con el tiempo (conservados). En taxonomía, el gen ARNr 16S es la herramienta más utilizada en la tipificación de bacterias.

Asimismo, la detección de genes particulares permite la identificación genotípica de especies. Por ejemplo, en *Helicobacter pylori,* la enzima ureasa le permite sobrevivir en el ácido estomacal y su síntesis está codificada por siete genes. Uno de ellos, el gen *ureA* permite la identificación de esta especie por el método de PCR.

Actualmente, la identificación de microorganismos puede realizarse mediante métodos de secuenciación genómica o técnicas de biología molecular.

5. Secuenciación genómica

En biología, “secuenciación” implica determinar el orden de las subunidades en una macromolécula. En el ADN (o del ARN), la secuencia génica corresponde al orden de los nucleótidos y su determinación en partes o todo el genoma microbiano por métodos de secuenciación permite inferir la relación filogenética entre especies o reconocer los subtipos dentro de una especie. La genómica es la disciplina encargada de mapear, secuenciar, analizar y comparar los genomas.

5.1. Secuenciación de ADN de primera generación. Método didesoxi de Sanger

Fue desarrollado en 1977, la técnica moderna utiliza dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes en cuatro tubos de reacción. Los fragmentos que se producen en cada tubo se separan por electroforesis y se detectan por su marcador fluorescente. Para llevar a cabo este método a la cadena de ADN molde monocatenaria se le añade: ADN polimerasa, un oligonucleótido que actúa como cebador y cuatro desoxirribonucleótido (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), dividiéndose la mezcla en cuatro tubos de reacción. Luego, a cada tubo se le añade una pequeña cantidad de un didesoxirribonucleótido (ddGTP, ddATP, ddTTP o ddCTP) marcado que actúa como terminador de cadena. La ADN polimerasa añade dNTPs complementarios a cada base hasta que añade un didesoxi análogo sin el grupo 3'-hidroxilo, en ese punto la elongación se detiene. Aunque ha sido superada por tecnologías más avanzadas, sigue siendo útil para secuenciar pequeñas regiones de ADN.

5.2. Secuenciación de ADN de segunda generación (Illumina)

Genera millones de pequeñas secuencias de ADN simultáneamente. Es altamente precisa y adecuada para proyectos de secuenciación de alto rendimiento. La síntesis del ADN se realiza mediante PCR en puente en nanoceldas que contiene el ADN molde. Se va incorporando un tipo de dNTP con marcador de fluorescencia a la vez, mientras con una cámara se capturan imágenes de cada ciclo de incorporación. Si se agrega dATP y emite

fluorescencia indica que ese nucleótido se ha incorporado, sino se continúa con el resto de dNTPs. En este caso, el terminador de la cadena son desoxirribonucleótidos (en lugar de didesoxi) que al incorporarse bloquea el 3'-hidroxilo en forma reversible deteniendo la elongación.

5.3. Secuenciación de ADN de tercera generación (nanotecnología)

La secuenciación SMRT (Single-Molecule Real-Time) opera en un chip de silicio. Las reacciones ocurren en nanocavidades (20 nm) que reducen la luz de fondo, permitiendo la detección de destellos individuales. En cada cavidad, los desoxirribonucleótidos con marcadores fluorescentes anclados al grupo pirofosfato son añadidos por la ADN polimerasa a una cadena creciente emitiendo un destello de luz de color específico al por liberación del pirofosfato.

5.4. Secuenciación de ADN de cuarta generación por nanoporos

La característica clave de la secuenciación de cuarta generación, también conocida como "secuenciación post-light", es que emplea detección por métodos eléctricos o de pH en lugar de ópticos (fluorescencia). El ADN pasa a través de nanoporos biológicos hechos de proteínas e identifica los nucleótidos de la cadena midiendo cambios de corriente eléctrica específicos para cada nucleótido. Puede secuenciar moléculas largas de ADN en tiempo real a alta velocidad, lo que permite analizar secuencias más largas y una preparación de muestras más simple.

6. Técnicas moleculares

Con la estructura del ADN a disposición a partir de 1953 gracias al descubrimiento de la doble hélice por Rosalind Franklin, James Watson y Francis Crick, la biología molecular cambió su enfoque: se dilucidaron los mecanismos de replicación y la función genética, claves para entender el papel de los genes en la herencia. Asimismo, las técnicas moleculares fueron surgiendo como métodos para el análisis y tipificación de los aislamientos bacterianos.

6.1. Huella Dactilar de Plásmidos (PF)

La huella dactilar de plásmidos (*Plasmid fingerprint*: PF) fue la primera técnica molecular utilizada como una herramienta de tipificación. Está técnica permite extraer los plásmidos por simples procedimientos de lisis celular y su posterior separación por electroforesis en gel. Al aplicar un campo eléctrico, los fragmentos más pequeños migran más rápido que los más grandes, creando un patrón de bandas (huella dactilar) distintivo en el gel. Esta técnica de tipificación de cepas fue empleada con éxito en el análisis epidemiológico de brotes de enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram-negativas.

6.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional fue desarrollada por Kary Mullis (Nobel 1993), su fundamento actual consiste en la creación de múltiples copias (amplificación) del ADN en ciclos repetidos, utilizando la enzima Taq-polimerasa. Su aplicación incluye: la detección de enfermedades hereditarias, identificación de microorganismos, análisis forense e investigación científica. La técnica original se mejoró reemplazando la ADN-polimerasa extraída de *E. coli* por la ADN-polimerasa denominada Taq-polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermophilus aquaticus*. Esta enzima es estable a altas temperaturas, una característica indispensable para esta técnica que requiere temperaturas entre 50 y 95 °C, sin embargo, puede cometer errores en la secuencia del ADN. El procedimiento completo requiere de:

1) **Extracción del ADN molde:** el material genético se extrae de diversas muestras utilizando enzimas de lisis o detergentes que desestabilizan la membrana celular. Dichas muestras podrán ser un cultivo puro del microorganismo o muestras independientes del cultivo (hisopado nasofaríngea, sangre, orina, esputo). El ADN molde puede estar presente en la muestra en pequeñas cantidades. En este trabajo práctico se utilizará la técnica de hervido o “boiling” en presencia del detergente tritón (ver parte práctica).
2) **Preparación de la Master Mix:** consiste en una solución acuosa que se prepara en agua ultrapura y contiene:
    - Dos oligonucleótidos cebadores (Forward y Reverse), cada uno complementarios a una de las dos hebras del ADN. Definen los extremos de la secuencia que se desea replicar y permiten que la ADN-polimerasa inicie la reacción.
    - 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (A, C, T, G): los dNTPs actúan como sustratos de la enzima para la síntesis del ADN.
    - Enzima Taq-polimerasa que polimeriza la síntesis del ADN.
    - Mg^{2+} que actúa como cofactor de la enzima
    - Solución buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
3) **Amplificación**: el ADN molde y la master mix se colocan en un pequeño tubo Eppendorf y se coloca en un equipo denominado termociclador que cumple con aproximadamente 30 ciclos de tres etapas (Figura 19):
    - **Desnaturalización** (95 °C): la doble hebra de ADN se separa en hebras sencillas.
    - **Hibridación:** los cebadores se unen por complementariedad a ambas hebras a 50-60 °C.
    - **Extensión:** la Taq-polimerasa incorpora dNTPs complementarios a partir de los cebadores generando nuevas hebras de ADN a 68-72 °C.

Al finalizar los ciclos, una sola copia inicial de ADN molde, teóricamente puede ser amplificada exponencialmente a 1 billón de copias.

4) **Detección del amplicón**: el ADN amplificado se detecta mediante electroforesis en gel. Se agrega al tubo un colorante fluorescente (gel red) y se siembra en el gel de agarosa, se aplica un voltaje a la cuba electroforética y al finalizar las bandas se observan bajo luz UV en un transiluminador.

Los factores que influyen en la validez de los resultados son la presencia de componentes inhibitorios, la calidad y pureza del ADN, la falta de optimización de los componentes de la reacción o de las condiciones de temperatura de los ciclos y el mal funcionamiento del termociclador. Todos estos factores pueden comprometer la especificidad y sensibilidad de la reacción, pudiendo llevar a resultados falsos-negativos, falsos-positivos, o no reproducibles.

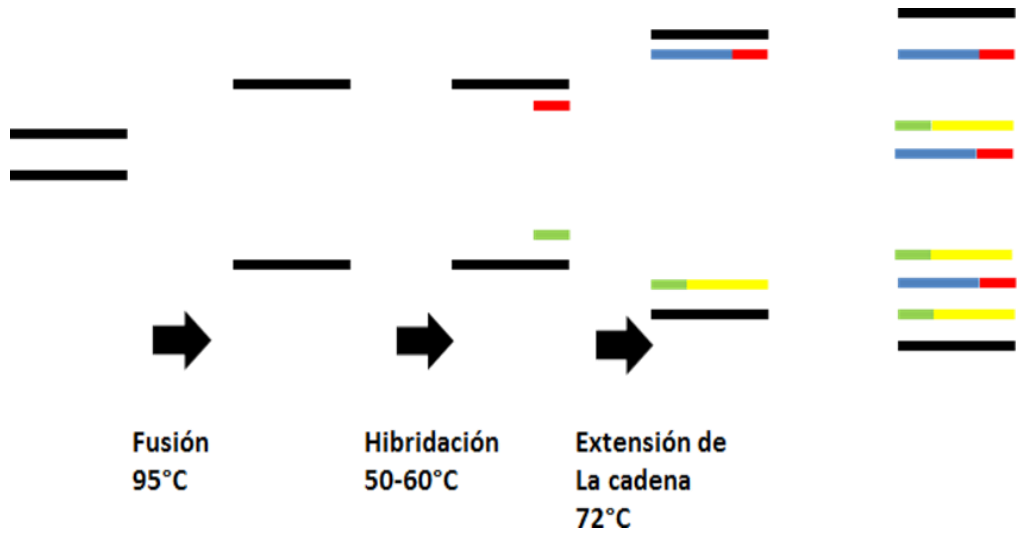


Figura 19. Esquema de ciclos de amplificación por PCR. Nota. Imagen modificada de https:// www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/Bt51A/1/material_docente/objeto/244484.

6.3. PCR en tiempo real (qPCR)

En esta técnica se añade en la mezcla de la reacción de PCR (ADN más master mix) un fluoróforo (colorante inespecífico: SYBR Green o sondas específicas). Esto permite obtener un resultado casi inmediato, sin necesidad de detectar el amplicón por electroforesis. A medida que el ADN molde se amplifica, el nivel de fluorescencia aumenta proporcionalmente y es detectado por el mismo termociclador provisto de sensores de fluorescencia. El colorante SYBR Green se une en forma inespecífica al ADN bicatenario, pero no se une a ADN monocatenario o ARN. En cambio, las sondas fluorescentes específicas de gen se preparan uniendo un colorante fluorescente a una sonda de ADN corta que coincida con la secuencia diana que se va a amplificar. El colorante emite fluorescencia al acumularse el ADN bicatenario de la secuencia correcta. La qPCR se puede utilizar para evaluar la abundancia de un patógeno en una muestra mediante la cuantificación de un gen característico de ese agente concreto.

6.4. PCR transcriptasa reversa (RT-PCR y RT-qPCR: *Reverse Transcriptase*)

Estas técnicas son útiles en la detección de virus ARN dado que se parte de ARN y se retrotranscribe en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa. Luego, se amplifica un parte específica del ADNc colocándolo en un tubo de reacción junto a la Master Mix por medio de una PCR o qPCR. La visualización de la amplificación se realizará mediante electroforesis en gel de agarosa (PCR clásica) o se detectará en forma simultánea por fluorescencia (qPCR). Para detectar SARS-CoV-2 se parte de un hisopado nasofaríngeo, se inactiva el virus con soluciones enzimáticas (proteasas y lipasas) para degradar las envolturas virales y se extrae el ADN humano y el ARN viral. La carga viral presente en la muestra depende de factores como: superficie del hisopo, técnica del personal de salud que tomó la muestra, tiempo entre la toma de la muestra y el procesado de la misma. Sin embargo, la carga viral de la muestra no necesariamente es proporcional a la carga viral real del paciente.

El protocolo de RT-qPCR de la red de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC-Estados Unidos), incluye la detección por separado del gen humano R y uno o dos genes virales (gen E que codifica para proteína de envoltura y/o gen N1 que codifica la proteína de la nucleocápside). La detección del ADN humano es crucial para evitar falsos negativos, ya que la ausencia del gen R indica problemas en la recolección, transporte o almacenamiento de la muestra.

El protocolo de RT-qPCR Dúplex diseñado por investigadores de la UNSL, IMIBIO-CONICET San Luis y el Laboratorio de Salud Pública detecta simultáneamente ambos genes, utilizando sondas específicas para cada gen: para el gen humano R se emplea la sonda Cy5 que emite fluorescencia roja que se diferencia de la fluorescencia verde que emite la sonda para el gen viral (Figura 20). Así, se simplifica el procedimiento y reduce costos sin comprometer la sensibilidad y eficacia del diagnóstico.

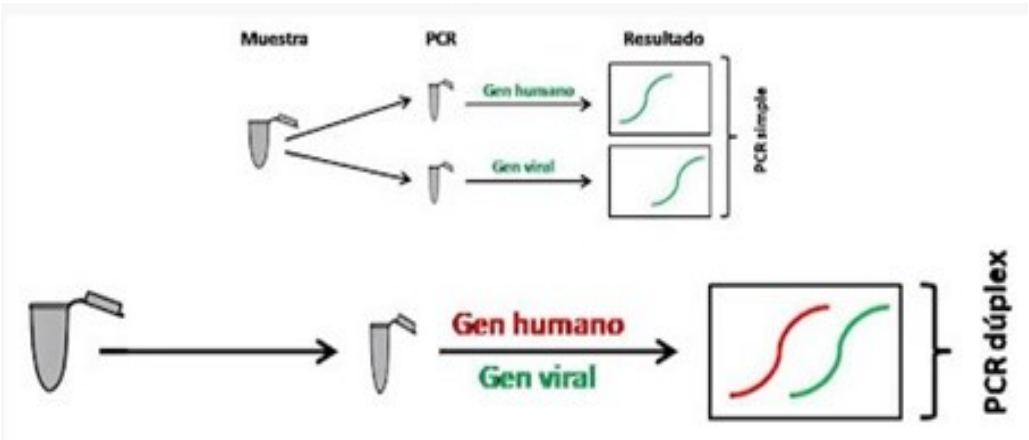


Figura 20. Esquema de RT-qPCR simple y dúplex. Nota. Imagen reproducida de https://noticias.unsl.edu.ar/28/09/2020/coronavirus-cientificos-de-la-unsl-logran-simplificar-los-testeos-por-pcr/

6.5. PCR de baja astringencia y un único cebador

Estas variantes de PCR se basan en la amplificación por PCR con las siguientes modificaciones:

1) Utilizan un único cebador cuya longitud variará según el método.
2) Emplean ciclos de baja astringencia (baja especificidad de apareamiento) que se logra con temperaturas de hibridación bajas (35-40 °C). Se entiende por astringencia o rigor al grado de especificidad en el apareamiento de los híbridos, por lo tanto, a mayor temperatura esta especificidad es mayor y a baja temperatura disminuye. Además, otra característica de ambas es la utilización de un único cebador.

6.5.1. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Esta técnica surge como una alternativa para ser utilizada cuando se desconoce la secuencia de ADN que se desea amplificar. Se utiliza un cebador corto (10 bases) que hibridan tanto en forward (5'-3') como reverse (3'-5') produciendo una amplificación al azar de uno o más segmentos de ADN siempre y cuando la distancia que hibrida en ambas cadenas sea óptima para que la ADN polimerasa amplifique el segmento. Para permitir la hibridación se trabaja a bajas temperaturas (Figura 22). La técnica relaciona y diferencia cepas aisladas de brotes siendo sensible y eficiente como la PFGE, pero menos costosa. Puede fallar la reproducibilidad si no estandarizan las condiciones de la reacción debido a las bajas temperaturas.

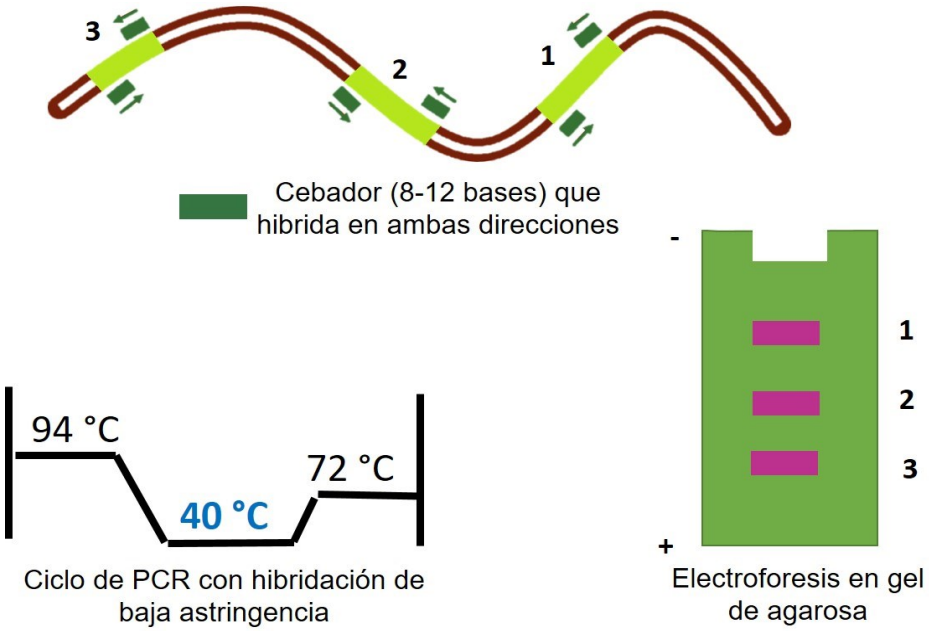


Figura 21. Esquema de hibridación de baja astringencia en RAPD-PCR. Nota. imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

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

El poder discriminatorio es variable de acuerdo al número y secuencia de los cebadores arbitrarios y a las condiciones de amplificación. Se utiliza 1 cebador simple de secuencia arbitraria de más de 20 nucleótidos y, a diferencia de RAPD, se realiza 2 ciclos de baja astringencia seguida de 1 ciclo de alta astringencia, obteniéndose segmentos de ADN amplificados de varios tamaños.

6.6. Técnicas moleculares que emplean enzimas de restricción

Las enzimas endonucleasas de restricción están presentes en la célula bacteriana y son capaces de reconocer secuencias de nucleótidos y romper el enlace fosfodiéster en el ADN. Naturalmente, su función consiste en destruir ADN extraño como un sistema de protección celular. Actualmente, estas enzimas son herramientas útiles en la clonación, ingeniería genética y tipificación como se describe a continuación.

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

El método RFLP, conocido por su alto poder de discriminación y reproducibilidad, se utiliza en mapeo genético animal y vegetal, pruebas de paternidad, estudios filogenéticos, farmacogenómica, tipificación de microorganismos y detección de genes de resistencia a antibióticos. Este método implica la extracción y purificación del ADN, amplificación por PCR, y digestión con enzimas de restricción que generan fragmentos de diferentes longitudes, los cuales se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, proporcionando un patrón de bandas único. En el Trabajo práctico 10 se utilizará esta técnica para reconocer cepas de *Helicobacter pylori* con mutaciones que les otorgan resistencia a antibióticos macrólidos.

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

La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) es una técnica altamente reproducible y discriminatoria utilizada como huella dactilar para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esta técnica permite comparar patrones de restricción del ADN para determinar relaciones entre aislamientos clínicos en vigilancia epidemiológica de brotes. Se emplea para separar ADN de alto peso molecular que no se separa por electroforesis convencional. Para ello, se embeben células intactas en agarosa y se someten a lisis con proteinasa K y digestión del ADN con la enzima de restricción. Luego, los largos fragmentos se separan por electroforesis utilizando una cámara electroforética especial con 3 pares de electrodos que forman un hexágono. La alternancia de los campos eléctricos en tres direcciones por lapsos de tiempo definidos reorientan los fragmentos en diferentes posiciones haciendo que migren en forma de zigzag (Figura 22).

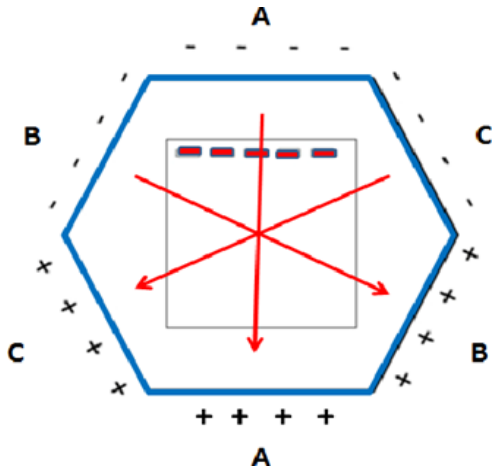


Figura 22. Distribución de los electrodos en el equipo de PFGE. Las flechas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes. A+, A-, B+, B-, C+, C-, muestran las posiciones de los pares de electrodos.

BIBLIOGRAFÍA Y MATERIAL MULTIMEDIA

Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., y Railean-Plugaru, V. (2017). Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1607–1623.

Coronavirus: Científicos de la UNSL logran simplificar los testeos por PCR | Noticias UNSL. (n.d.). Noticias UNSL. https://noticias.unsl.edu.ar/28/09/2020/coronavirus-cientificos-de-la-unsl-logran-simplificar-los-testeos-por-pcr/

Flores, O. (27/09/2020). Avances contra Covid - Coronavirus en Argentina: científicos puntanos diseñaron un método que simplifica y acelera los test PCR. *Diario Clarín*. https://www.clarin.com/sociedad/coronavirus-argentina-cientificos-puntanos-disenaron-metodo-simplifica-acelera-test-pcr_0_fubUU_6uX.html

Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., y Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130.

Forbes, B. A., Sahm, D. F., Neissfeld, A. J. y Trevino, A. (2004). *Diagnóstico Microbiológico Bailey y Scott*. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), 280-322

Joaquín Rey. (2012, enero 24). Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [Video]. YouTube.

https://www.youtube.com/watch?v=eNB4UuO1rRw

Quick Biochemistry Basics. (2019, octubre 3). Sanger sequencing [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=KTstRrDTmWI

UNSL TV. (2020, septiembre 28). Nuevo desarrollo científico: logran simplificar los testeos por PCR [Video]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=LiPbR9u6fmo

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Extraer material genético de un cultivo microbiano axénico.
2) Amplificar el gen *ureA* por PCR para la identificación de *Helicobacter pylori*.

PARTE PRÁCTICA

1. Extraer ADN de un cultivo puro por el método de "boiling")

1) Extraer un Eppendorf de 1 ml y colocar en forma aséptica 150 µl de Tritón X - 100 al 1 % en buffer Tris-EDTA 1X. El Tris mantiene estable el pH, mientras que el EDTA compleja los iones Mg^{2+} evitando que este actúe como cofactor de endonucleasas propias de la bacteria que se liberan y podrían degradar el ADN.
2) Tomar una ansada de cultivo de *H. pylori* y suspender en el detergente Tritón.
3) Hervir en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos. El efecto conjunto del detergente Tritón y el calentamiento producen la lisis bacteriana y la liberación del ADN.
4) Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos. Se obtendrá un pellet correspondiente a los restos bacterianos y un sobrenadante con el ADN molde.
5) Reservar el sobrenadante hasta tener preparada la Master Mix.

2. Preparación de la Master Mix

➔ *Reactivos de la Master Mix*

- Dos cebadores: en nuestro caso la secuencia de los cebadores son:
    - *ureA*-F (forward): 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
    - *ureA*-R (reverse): 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'
- 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) 0,2 mM.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 2,5 mM de Mg^{2+}.
- Solución tampón o buffer 1X
- Taq-polimerasa 1 U.
- H_2O ultrapura estéril.
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

➔ *Procedimiento*

1) Extraer un Eppendorf de 1 ml y colocar primero el volumen de H_2O ultrapura estéril y luego colocar el resto de los componentes. Los volúmenes están calculados para procesar 4 muestras de ADN.
2) Adicionar la enzima Taq-Polimerasa al final.
3) En un tubo para PCR, adicionar 45 µl de Master mix y 5 µl del ADN molde.

3. Amplificación del material genético por PCR

1) Colocar el tubo de reacción en el termociclador y aplicar el siguiente programa:
   - *Desnaturalización inicial:* 94 °C durante 10 minutos: permite que todo el ADN llegue fusionado al primer ciclo de desnaturalización.
   - *33 ciclos de:*
     - *Desnaturalización:* 94 °C, 1 min
     - *Hibridación:* 58 °C, 1 min
     - *Extensión:* 72 °C, 1 min
   - *Extensión final:* 72 °C 10 min. Para asegurarse que todas las copias de ADN hayan finalizado su síntesis.

4. Detección del amplicón-Corrida electroforética

1) Preparar un gel de agarosa al 1,8 % en buffer de corrida Tris-Acético-EDTA (0,5X).
2) Adicionar 1 µl de GelRed al tubo de reacción.
3) Sembrar en cada calle o pocillo, 10 - 12 µl de las muestras amplificadas.
4) Someter a una corrida electroforética con voltaje constante (80 voltios) durante 45 min.
5) Observar en un transiluminador de luz UV la banda amplificada de **411 pb**.

6 Determinación cuantitativa del crecimiento microbiano

OBJETIVOS

1) Comprender los métodos cuantitativos utilizados en microbiología para medir el crecimiento y las poblaciones microbianas.
2) Adquirir conocimientos sobre los métodos directos e indirectos para la determinación de células y biomasa.
3) Familiarizarse con los métodos de cuantificación para determinar el número de partículas virales.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Clasificación de los métodos cuantitativos de crecimiento microbiano

En microbiología se requieren métodos para cuantificar el número de microorganismos contaminantes en una determinada muestra (medicamentos, cosméticos, alimentos) así como también determinar el crecimiento microbiano (magnitud de la población total) durante un proceso industrial para obtener un producto de interés (antibióticos, productos de origen biológico, yogur, cerveza). Con estos propósitos los métodos disponibles miden el **número de células, la masa y la actividad celular** en forma directa o indirecta (Figura 23).

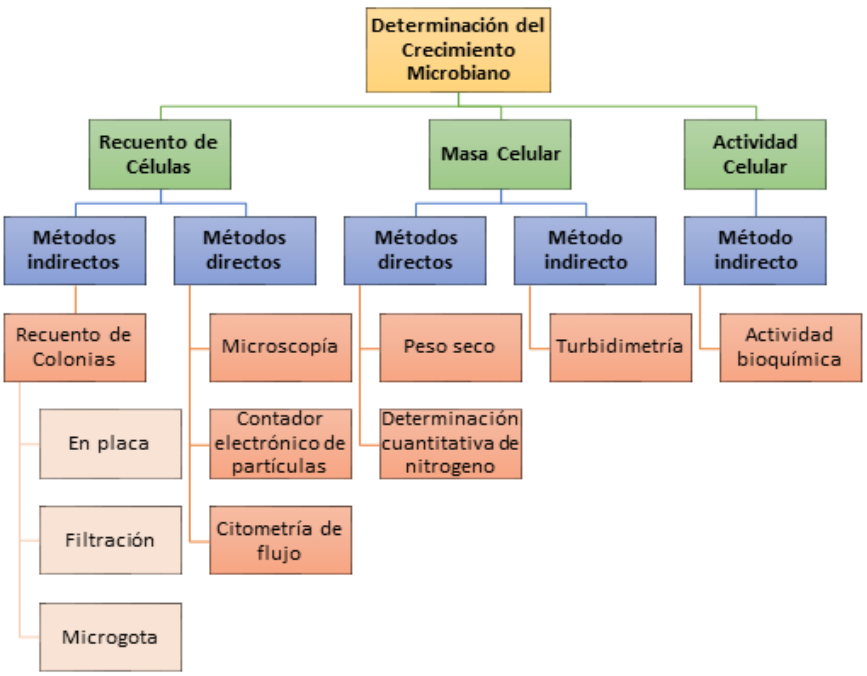


Figura 23. Clasificación de métodos para la determinación del crecimiento microbiano. Nota. Imagen creada por Lic. Enzo Landolfo. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2. Recuento de células

2.1. Métodos directos

2.1.1. Microscopía

Para el recuento de las bacterias se emplean cámaras especiales como las de Petroff-Hauser o la de Neubauer. La cámara de Neubauer tiene una superficie total de 9 mm^2, dividida en 9 cuadrados de 1 mm^2 cada uno. El cuadrado central se subdivide en 25 cuadraditos, cada uno de los cuales a su vez están divididos en 16 cuadraditos más pequeños. El espacio entre el portaobjetos reticulado y el cubreobjetos es de 0,1 mm, 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. En el sector del cuadrado central, que se emplea para el recuento, el volumen será 0,1 mm^3 (o 0,0001 cm^3 o ml). (Figura 24).

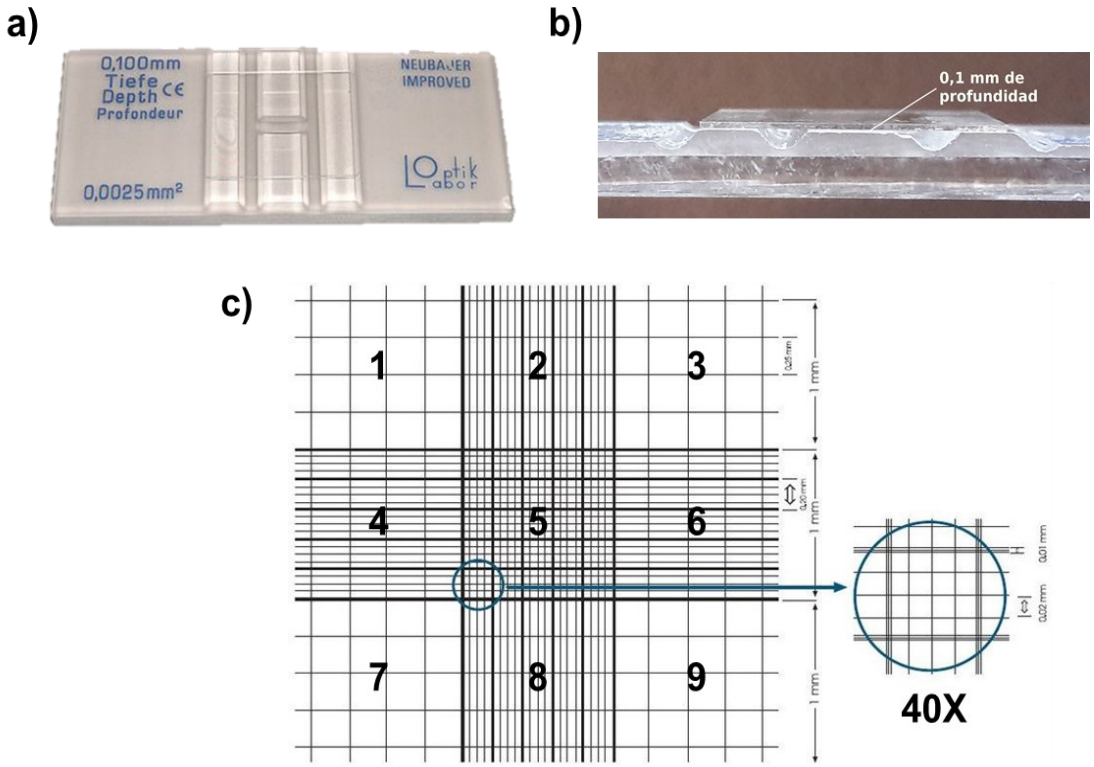


Figura 24. Cámara de Neubauer: vista frontal (a), vista lateral (b), retículo visto al microscopio (c). Nota. Adaptado de Santi Badia. Licencia CC-BY-SA 4.0. Wikimedia Commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg.

➔ Procedimiento

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 y sacar el valor promedio. Es necesario contar un mínimo de 100 células totales para que el recuento obtenido sea exacto.

➔ *Cálculo:*

Se realiza utilizando la siguiente ecuación,

número de células / ml = N x 25 x 10^4 x inversa de la dilución

Donde,

N = valor promedio del recuento de los 5 cuadraditos marcados en la Figura 23.

25 = número total de cuadraditos en el cuadrado central. Al multiplicar por este valor se obtienen la cantidad de células en 1 mm^2

10^4= Inversa del volumen en el cuadrado central. Corresponde al factor de conversión de volumen para llevar a 1 ml.

Inversa de la dilución: si 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, este término no deberá incluirse en el cálculo final del número de microorganismos presentes en la muestra en estudio.

Expresión del resultado: Células /cm^3 o ml

➔ *Ventajas*

✓ Se requiere poco instrumental.

✓ Los resultados se obtienen rápidamente.

✓ Se puede observar la morfología celular.

➔ *Desventajas*:

✓ No se distinguen entre células vivas y muertas, salvo que se utilice un colorante que las distinga.

✓ Las células muy 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.

✓ El conteo debe realizarse en un tiempo corto, dado que las células se dividen rápido haciendo variar el resultado.

2.1.2. Recuento utilizando contador electrónico de células

Se puede utilizar el contador automático de Coulter, en el cual se hace pasar una suspensión microbiana a través de un pequeño orificio por el cual fluye una corriente eléctrica. Cuando una célula atraviesa el orificio, se genera un aumento de la resistencia eléctrica y la célula es detectada por el contador. El contador permite determinar el número y el tamaño de las células. Sin embargo, como este método mide cualquier tipo de partícula

que se encuentre suspendida en el líquido, su aplicación se limita sólo a suspensiones acuosas de microorganismos libres de partículas de otro tipo.

2.1.3. Citometría de flujo

En la década del 60, la citometría de flujo constituyó un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas. Este método permite el estudio multiparamétrico de suspensiones microbianas y otras partículas biológicas. Las células individuales fluyen a gran velocidad desde un medio líquido, a través de una celda de flujo, y son atravesadas por una luz monocromática láser. Cada célula dispersa o bloquea la luz y las señales llegan a diferentes detectores. De este modo, se estudian diversas características como forma, tamaño, características fluorescentes (al incubarse con anticuerpos que contienen fluorocromos), complejidad citoplasmática, composición antigénica y bioquímica (Figura 25).

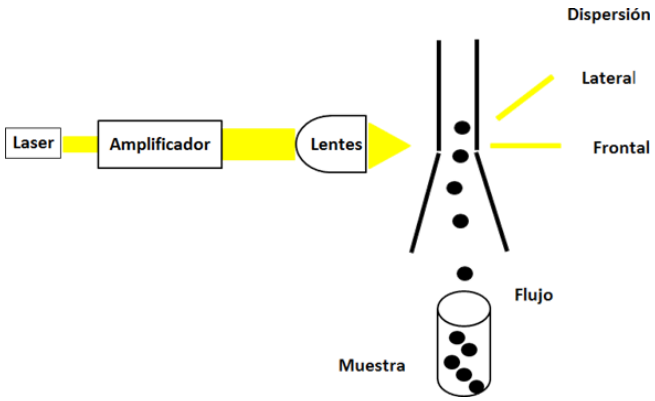


Figura 25. Principios de la citometría de flujo. Nota. Imagen de dominio público.

➔ *Ventajas*

✓ Permite observar múltiples características de cada célula, entre 5 y 17 parámetros por célula individual.

✓ Técnica rápida: permite medir un gran número de células por segundo

✓ Alta sensibilidad: Se logran detectar poblaciones con baja frecuencia poblacional.

➔ *Aplicaciones*

✓ Hematología: recuento de reticulocitos, fórmula leucocitaria, análisis de médula ósea.

✓ Farmacología: estudios de cinética celular.

✓ Inmunología: diferenciación de subpoblaciones T, estimulación linfocitaria.

✓ Oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorización del tratamiento.

✓ Microbiología clínica: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.

✓ Genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

2.2. Métodos indirectos

2.2.1. Recuento de colonias en placa

Este es el método más común para determinar el número de células y 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.

➔ *Asunciones del método*

Al aplicar este método se asume que:

✓ Todo organismo viable origina una colonia.

✓ La suspensión microbiana es homogénea y no se encuentran agregados presentes.

✓ Todas las bacterias crecen en el medio y condiciones de incubación.

➔ *Procedimiento*

1) Dilución del yogurt: Colocar 5 gr de yogurt en 45 ml de solución fisiológica (SF) para obtener la dilución 1/10 = 10^{-1} (Figura 26a).
2) Marcar los tubos y las placas con todos los signos de identificación necesarios.
3) Realizar diluciones seriadas al décimo (Figura 26b). Para ello, se toman con una pipeta estéril 0,5 ml de la primera dilución y se transfiere a un tubo con 4,5 ml de diluyente estéril (solución salina o solución peptonada) y se obtiene la dilución 1/100 (10^{-2}). El procedimiento se repite en este caso hasta la dilución 10^{-7} o 10^{-8}. Debe tenerse la precaución de usar una pipeta (o un tip estéril en caso de utilizar micropipetas) distinta para cada tubo de dilución. La cantidad de diluciones depende de la magnitud de la población microbiana inicialmente presente en la muestra, en el caso del yogur el Código Alimentario Argentino exige un contenido mínimo de 10^7 UFC/g de producto.
4) Sembrar 0,1 ml de las tres últimas diluciones en placas de Petri con agar MRS, un medio adecuado para el desarrollo de lactobacilos y bacterias ácido lácticas. Luego diseminar el líquido con una espátula de Drigalski estéril. Esta siembra se hace como mínimo por duplicado (Figura 26b).
5) Incubar las placas invertidas en estufa a 37 °C durante 24-48 horas. Una vez que han desarrollado las colonias debe realizarse el recuento. Para ello, se emplea una cámara cuentacolonias que consta de un soporte para la placa de Petri, un sistema de iluminación y una lupa para facilitar la visualización (Figura 26c).

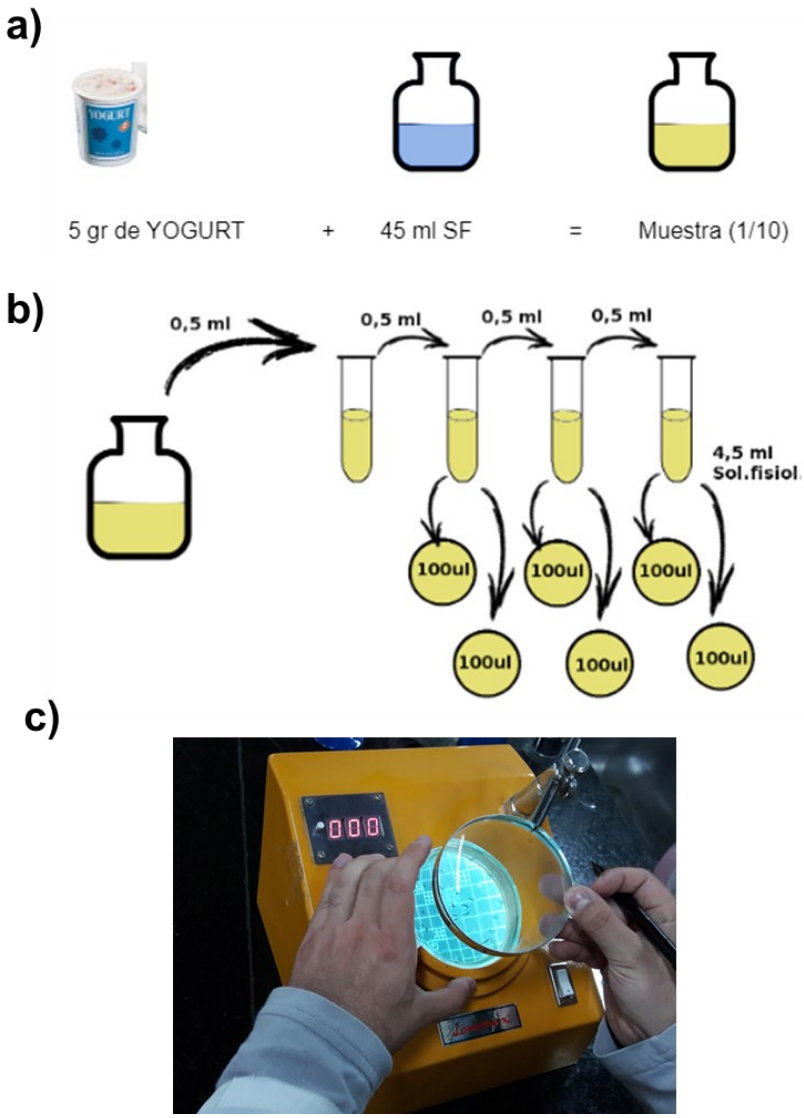


Figura 26. Recuento de colonias en placa: **a)** Preparación de la primera dilución de yogurt, **b)** Esquema de diluciones seriadas y siembra en placas de Petri, **c)** Cámara cuentacolonias con contador electrónico. Nota: Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez, bajo licencia CC-BY-SA.

➔ *Cálculo*

Se deben seleccionar las placas que contengan una cantidad de colonias en el orden entre 30 y 300 colonias, para aumentar la exactitud del método y minimizar la interferencia por la superposición de colonias cuando el recuento supera 300 colonias.

Número colonias/ml = N x IVS x ID

Donde,

N = valor promedio del recuento de colonias.

IVS = inversa del volumen de siembra, si se sembró 1 ml este valor puede omitirse.

ID = inversa de la dilución correspondiente a las placas seleccionadas.

Expresión del resultado: Unidades formadoras de colonias (UFC)/ml

Aclaración: Si bien UFC/ml suele ser la expresión más utilizada cuando la muestra inicial es líquida, en el caso del yogurt la expresión se refiere a los gramos de muestra siendo la denominación correcta UFC/g.

➔ *Ventajas*

✓ Método muy sensible, ya que cualquier organismo viable originará una colonia.

✓ Permite el conteo de distintos tipos de organismos en base a las diferentes formas, tamaños, colores y texturas de las colonias.

✓ Facilita la identificación del microorganismo (por repique se puede obtener un cultivo puro y su posterior identificación).

➔ *Desventajas*

✓ No hay seguridad de que una colonia se originó de una sola célula (cuando dos células originales de la misma especie quedan depositadas en el agar muy cerca una de otra, dan lugar a colonias que visualmente se identifica como una sola).

✓ 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. Si hay menos de 30 se comente un gran error estadístico, mientras que si hay más de 300 la superposición de colonias genera un error por defecto.

2.2.2. Recuento de colonias en placa por filtración

La técnica por filtración a través de membrana constituye una variante del recuento en placa y es útil para grandes volúmenes de muestra con baja población microbiana. Dado que es un método de concentración el resultado debe referirse siempre al volumen total de muestra filtrada (por ejemplo, 100 ml).

El método se basa en pasar la muestra por el filtro y retener los microorganismos sobre la superficie de la membrana. Si la membrana se deposita en una placa con un medio de cultivo adecuado, las células retenidas se desarrollarán y el número de colonias indicará cuantitativamente la población microbiana. Una vez que los microorganismos se han desarrollado, luego de la incubación, se sigue igual que la técnica de recuento en placa.

En la industria farmacéutica esta variante es utilizada para el monitoreo de agua purificada y agua para inyectables cuyos límites microbianos deben ser no más de 100 UFC/ml y 10 UFC/100 ml, respectivamente. En el caso del agua purificada si el producto acuoso tiene un límite de 10^2 UFC/ml se requiere un sistema que asegure una calidad de agua de menos de 100 UFC/10 o 100 ml de agua.

2.2.3. Método de recuento por microgota (Método Miles y Misra)

El método fue desarrollado y publicado en 1938 por los científicos Miles y Misra. También denominado actualmente como método de la microgota, la técnica es una versión a una escala diez veces menor que el procedimiento de recuento tradicional. Para ello, las diluciones se realizan en 100 µl y en una sola placa con medio agarizado se colocan pequeñas gotas (generalmente 10 µl) por triplicado (Figura 27). Luego de la incubación, se contarán las gotas que contengan entre 3 y 30 colonias. De este modo, se puede determinar el recuento de entre 4 y 6 diluciones en simultáneo utilizando un única placa de Petri, reduciendo el gasto de materiales (placas, agar y diluyente) y el costo.

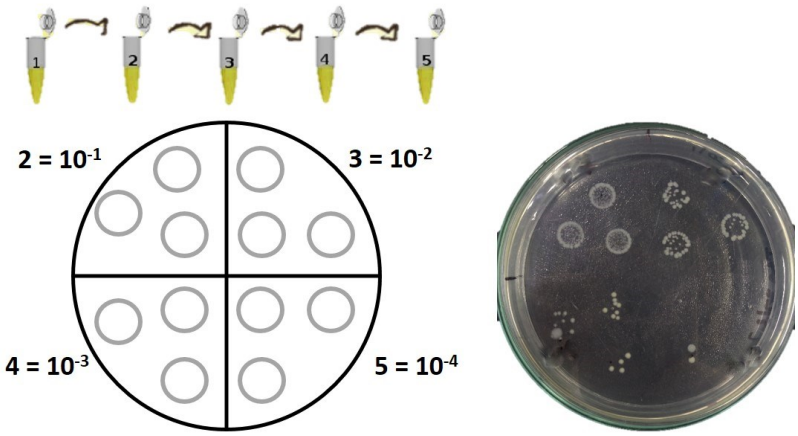


Figura 27. Esquema de diluciones seriadas y siembra por el método de microgota (izquierda), crecimiento de colonias de *E. coli* en las gotas luego de la incubación (derecha). Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Imagen tomada por Lic. Fermín Climent. Reproducida con permiso.

3. Masa celular

3.1. Método directo-Determinación por peso seco

Esta es la técnica se aplica principalmente en trabajos de investigación, es la más directa para estimar la masa de células, la más segura y reproducible. Sin embargo, sólo puede utilizarse para suspensiones muy densas de células.

➔ *Procedimiento*

1) Tomar un volumen conocido de la suspensión celular (5-10 ml) y depositarlo en tubos de centrífuga.
2) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm para sedimentar las células.
3) Desechar el sobrenadante y lavar el sedimento celular con agua destilada dos veces, centrifugando cada vez. Esto se realiza para eliminar materiales no consumidos del medio de cultivo que pueden aportar peso y error por exceso en la medida.

4) Trasvasar la biomasa cuantitativamente a una cápsula de porcelana previamente tarada con ayuda de agua destilada y llevar a estufa entre 90-105 °C hasta peso constante, es decir cuando tres pesadas sucesivas indiquen el mismo valor (Figura 28).

Figura 28. Esquema para la determinación de peso seco. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

➔ *Cálculo*

5 ml de cultivo → (P-T) g de biomasa

1000 ml de cultivo → **x = g de biomasa**

Donde,

P = Peso final de la cápsula

T = Tara de la cápsula

Expresión del resultado: gramos de biomasa/litro de caldo

3.2. Método indirecto-Turbidimetría

La turbidez que se genera durante el crecimiento microbiano puede utilizarse para estimar en forma indirecta la masa celular. Esto se debe a que un cultivo bacteriano en un medio líquido actúa como una suspensión coloidal, dispersando o reflejando la luz que pasa a través de dicha suspensión. Dentro de ciertos límites, la luz dispersada o reflejada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración celular del cultivo. Por lo tanto, se puede estimar dicha concentración aplicando **Nefelometría (**la medida de la reflexión de los rayos de luz), o bien **Turbidimetría**, (la medida del porcentaje de dispersión de la luz). Esta segunda aproximación es la que se utiliza con mayor frecuencia y las mediciones en este caso se realizan utilizando un fotocolorímetro o un espectrofotómetro. Este instrumento selecciona con un filtro un haz de luz monocromático (es decir de una sola longitud de onda). Esta luz pasa a través de un cultivo microbiano y la cantidad de luz transmitida se mide mediante una célula fotoeléctrica conectada a un galvanómetro. El resultado podrá expresarse como porcentaje de luz transmitida conocido como tramitancia.

Dentro de ciertos límites, este porcentaje es inversamente proporcional a la concentración de células. En la práctica, generalmente, resulta más útil expresar la turbidez como densidad óptica (DO), es decir como porcentaje de luz dispersada cuyo valor adimensional es directamente proporcional a la concentración de células. Es necesario aclarar que en muchos casos se utilizan los términos absorbancia (que solo considera la absorción de un haz de luz) y DO como sinónimos, sin embargo, el primero solo se aplica a soluciones reales homogéneas que se rigen por la ley de Lambert Beer, mientras que la DO considera tanto la absorción como la dispersión y se aplica en el caso de tratarse de suspensiones.

Expresión del resultado: DO es un valor adimensional

➔ *Procedimiento y cálculo*

1) Seleccionar la longitud de onda de trabajo (580, 600, 630 nm).
2) Colocar la suspensión microbiana en una celda de vidrio y colocarla en el fotocolorímetro para obtener el valor de DO. Es importante calibrar el instrumento con el medio de cultivo estéril, en especial si se trata de un medio coloreado que absorbe a la longitud de onda de trabajo.
3) Correlacionar el valor obtenido con la concentración celular determinada por alguno de los métodos ya descritos (peso seco, recuento en placa o recuento por microscopía). Al medir la turbidez y concentración de varias diluciones se confecciona una curva de calibración DO vs concentración celular (Figura 29).

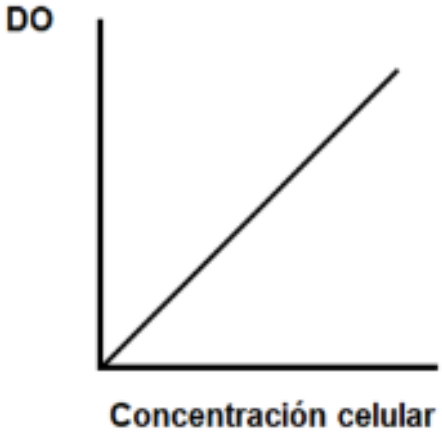


Figura 29. Curva de calibración turbidimétrica. La concentración celular puede expresarse en células/ml, UFC/ml o g/l dependiendo del método utilizado. Nota: Imagen de dominio público.

➔ *Ventajas*

✓ Facilidad de ejecución

✓ Suministra resultados inmediatos

➔ *Desventajas*

✓ No pueden utilizarse para materiales intensamente coloreados o que llevan en suspensión materiales distintos a los microorganismos.

✓ No es aplicable a suspensiones no homogéneas (organismos filamentosos).

4. Actividad celular

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

1) *Consumo de oxígeno:* para organismos aeróbicos, la velocidad de consumo es proporcional a la masa celular.
2) *Liberación de anhídrido carbónico:* para organismos anaerobios.
3) *Liberación de productos de fermentación:* puede determinarse la formación de ácidos a partir de hidratos de carbono (por ejemplo: ácido láctico en bacterias acidolácticas). El ácido formado se puede valorar por una titulación ácido-base o mediante una reacción colorimétrica. A mayor cantidad de ácido, mayor población microbiana.

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

5. Recuento de partículas virales

La cuantificación vírica es requerida para la producción de vacunas, para evaluar la terapia antiviral en un paciente o en investigación para saber la concentración de virus que se añaden a los cultivos tisulares.

5.1. Ensayos de formación de calvas o placas

El método de ensayo en placas se utiliza para el recuento de virus que producen lisis celular. Consiste en infectar cultivos tisulares dispuestos en placas o en pocillos, con diluciones del virus. Luego de retirar el medio de cultivo, tras una breve incubación, se cubren los cultivos con agar semisólido para evitar que el virus se disperse libremente y sólo infecta células contiguas a las ya infectadas. Transcurridos unos días se observa la aparición de zonas circulares transparentes, denominadas calvas o placas, producto de la lisis celular. El número de placas depende del número de viriones y se asume que cada una se formó a partir de una partícula vírica en la muestra. Al igual que las colonias de bacterias o levaduras, pueden contarse a simple vista. Puede retirarse el agar semisólido y teñir las células con cristal violeta para favorecer el contraste. El resultado se expresa como unidades formadoras de placa o PFU por mililitro **(PFU/ml)**. Este método es útil para la determinación de bacteriófagos.

5.2. Determinación de CCID50

La CCID50 cuantifica la cantidad de virus necesaria para producir cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad (destrucción celular), conocidos como efectos citopáticos, en el 50 % de las células o cultivos infectados. Se considera más precisa que los métodos anteriores porque las concentraciones que producen el 100% de efecto pueden variar ampliamente, siendo el valor del 50% el más preciso. Se aplica una fórmula matemática que se emplea para otras mediciones como la dosis infectiva 50. Estadísticamente, una unidad CCID50 equivale a 0,69 PFU.

BIBLIOGRAFÍA

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg, H. S. (1997). *Tratado de Microbiología* (4ª Ed.). Barcelona, España: Salvat S. A.

Horak, C., Zarankin, E., Torno, G., Cerra, H., Fernández, M. y Lagomarsino, M. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

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

PARTE PRÁCTICA

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

Realizar diluciones de una suspensión de levaduras o cianobacteria para su recuento en cámara de Neubauer. Calcular la concentración celular en **células/ml.**

2. Recuento en placa (método indirecto)

1) Efectuar diluciones al décimo de un producto alimenticio (yogurt) que posee una carga de lactobacilos conocida, para corroborar por recuento de colonias en placa de Petri. Seguir el protocolo designado por el docente.

2) Colocar 0,1 ml de 2 diluciones consecutivas sobre la superficie del medio MRS en placas de Petri y se extender con espátula de Drigalski esterilizada con alcohol hasta su completa absorción.
3) Incubar en aerobiosis 48 horas a 37 °C
4) Realizar el recuento de colonias en las placas que contengan entre 30-300 colonias y calcular la concentración celular en **UFC/ml.**

3. Cálculo de la masa celular por determinación de peso seco (método directo)

El procedimiento será demostrativo. Se realizarán ejercicios de cálculo en base a los resultados proporcionados por los docentes.

7 Cinética del crecimiento microbiano

OBJETIVOS

1) Conocer las características de los distintos sistemas de cultivos microbianos y sus aplicaciones.
2) Analizar la cinética de crecimiento en un cultivo discontinuo para determinar diferentes parámetros cinéticos.
3) Familiarizarse con el efecto Crabtree y las diferentes vías metabólicas utilizadas por las levaduras en distintas condiciones nutricionales y ambientales.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Sistemas de cultivos microbianos

Las poblaciones microbianas siguen un crecimiento en diferentes fases. Comprender el comportamiento de la población microbiana es crucial para abordar el control en enfermedades infecciosas (curvas de muerte), el deterioro de alimentos y medicamentos por contaminación microbiana, los procesos de biotecnológicos para la obtención de diferentes productos con valor agregado a partir de una materia prima simple. En este último aspecto la obtención de productos microbianos implica la utilización de diferentes sistemas de cultivo en escalas que van desde el Erlenmeyer (usado en los laboratorios) a los biorreactores de escala industrial. Tradicionalmente el término **fermentación** tiene su origen en la producción de bebidas alcohólicas (cerveza y vino) a partir del metabolismo microbiano anaeróbico, pero actualmente su uso se extiende a los procesos aeróbicos la obtención de biomasa, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, enzimas, biopolímeros, antimicrobianos, esteroides, vacunas, entre otros.

En un proceso fermentativo el objetivo principal es el crecimiento del microorganismo en condiciones ambientales controladas (temperatura, pH, concentración de oxígeno) para estimular la síntesis del producto de interés. El cultivo del microorganismo es el paso inicial de una serie de etapas.

1.1. Cultivo discontinuo

El cultivo discontinuo o en lote es el método de cultivo más simple en el cual un volumen limitado de medio de cultivo es inoculado con una determinada cantidad inicial de microorganismo (inóculo o starter). El microorganismo crece hasta agotar el nutriente esencial del medio o bien hasta la acumulación de subproductos tóxicos que inhiben su crecimiento. Al no entrar ni salir nutrientes, este puede ser considerado un sistema “cerrado”.

1.1.1. Fases de crecimiento

La inoculación del fermentador es seguida por una serie de fases (Figura 30):

1) **Fase de latencia, lag o período de retardo**, en esta fase no hay división celular, por lo tanto, la velocidad de crecimiento es cercana a cero. Existe un aumento de la masa celular individual. Este tiempo de latencia no es deseado en los procesos industriales y puede acortarse utilizando inóculos densos (3-10%) provenientes de cultivos en fase exponencial en el mismo medio que el que se utilizará en la fermentación.
2) **Fase de crecimiento exponencial**, el crecimiento ocurre a la máxima velocidad ($\mu_{máx}$) 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**, la concentración de microorganismo alcanza un valor máximo y permanece constante. Al igual que en la fase de latencia, la velocidad de crecimiento se acerca a cero.
4) **Fase de declinación o muerte**, última etapa donde la concentración decrece como resultado de la autolisis o como consecuencia del metabolismo de mantenimiento. La velocidad de crecimiento adquiere un valor negativo menor a cero.

La duración de cada una de estas fases depende del microorganismo en estudio, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones ambientales (temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno).

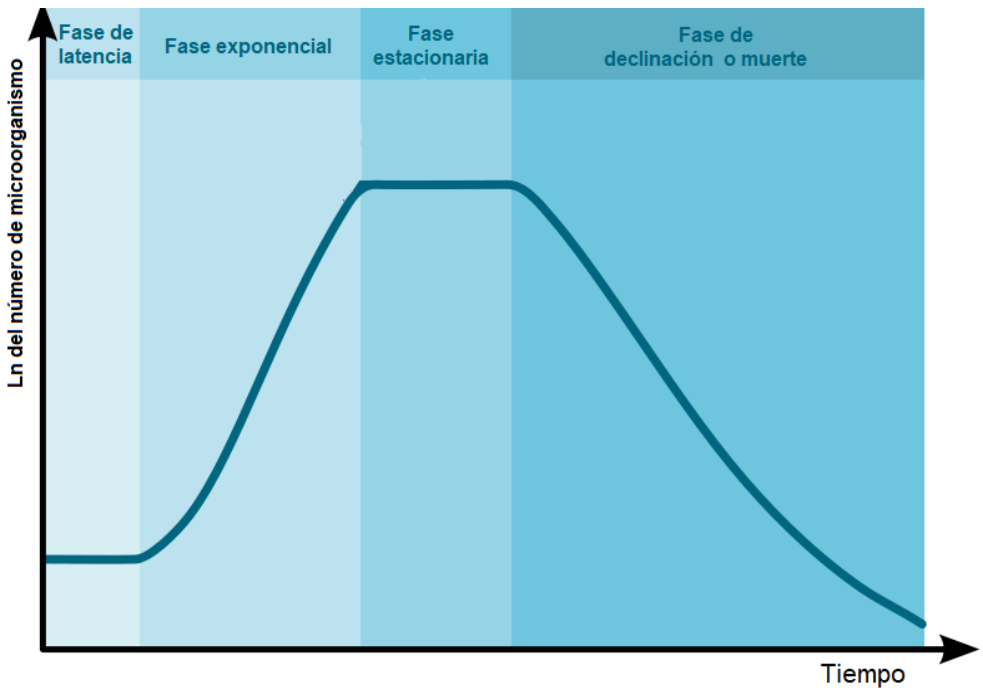


Figura 30. Curva de crecimiento en un sistema de cultivo discontinuo. Nota. Imagen de Michał Komorniczak. Licencia CC-BY-SA 3.0. Wikimedia commons. Traducida al español por Farm. Mariana Cozzolino. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_growth_en.svg

Pueden observarse, además, dos fases o períodos transicionales de crecimiento, que se denominan de aceleración (ocurre entre la fase lag y exponencial) y desaceleración (entre las fases exponencial y estacionaria) debido a que un cultivo pasa gradualmente de una fase a otra. Esto se debe a que no todas las células están exactamente en idénticas condiciones fisiológicas hacia el final de una determinada fase. En la aceleración la velocidad de crecimiento comienza a aumentar hasta alcanzar su valor máximo, mientras que en el periodo de desaceleración dicha velocidad disminuye hasta un valor cercano a cero.

1.1.2. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

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 pueden considerarse 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 mencionadas anteriormente.

La velocidad de crecimiento se expresa:

$$dx/dt = \mu x \qquad \text{(Ecuación 6.1)}$$

Donde:

x = concentración del microorganismo (g/l, células/ml, UFC/ml o DO).

μ = velocidad específica de crecimiento (unidades de tiempo^{-1}: Ejemplo h^{-1})

Al integrar la ecuación 6.1, considerando que μ constante (esto ocurre cuando hay exceso de sustrato) se obtiene:

$$x = x_0 e^{\mu t} \qquad \text{(Ecuación 6.2)}$$

Donde:

x0 = concentración inicial de microorganismos.

Al aplicar logaritmo natural a la ecuación 6.2 se obtiene:

$$\ln x / x_0 = \mu t \qquad \text{(Ecuación 6.3)}$$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu t \qquad \text{(Ecuación 6.4)}$$

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 x vs *t* con los datos obtenidos experimentalmente durante la fase exponencial podemos calcular el μ_{max} para esa combinación de microorganismo/medio de cultivo (Figura 31).

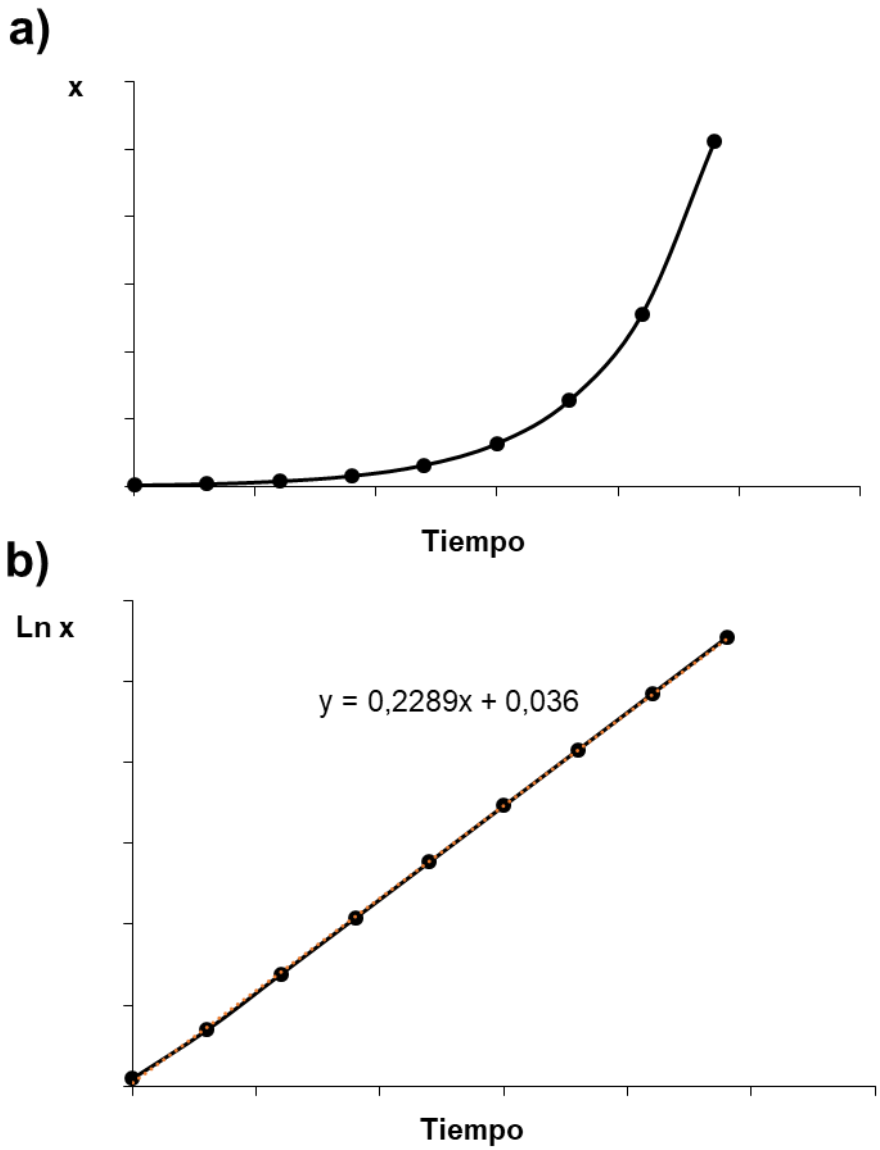


Figura 31. a) Gráfica x vs t correspondiente a la fase exponencial (ecuación 6.2). **b)** Gráfica ln *x* vs *t* correspondiente al reordenamiento de la ecuación 6.4 como $\ln x = \mu \cdot t + \ln x_0$. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

La ecuación 6.2 nos muestra que la concentración del microorganismo aumentará exponencialmente con el tiempo. A partir de la ecuación 6.3 podemos calcular el **tiempo de generación o duplicación** del microorganismo (t_g), que se define como el periodo de tiempo en que la biomasa se *duplica*, es decir que $x = 2x_0$, por lo tanto:

$$\ln \frac{2x0}{x_0} = \mu t \qquad \text{(Ecuación 6.5)}$$

simplificando y reordenando,

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu} \qquad \text{(Ecuación 6.6)}$$

1.1.3. Relación entre velocidad específica de crecimiento y consumo de sustrato

La ecuación 6.2 ignora que el crecimiento acarrea el consumo de sustrato y la acumulación de subproductos tóxicos que desvían a la velocidad específica de crecimiento de su valor máximo hacia valores menores. La disminución de este parámetro y el cese de crecimiento hasta ingresar en la fase estacionaria fueron descriptas por Monod quien encontró que existe una relación sencilla entre μ y la concentración de sustrato esencial limitante para el crecimiento. Esta relación es idéntica a la existente entre la velocidad de reacción de una enzima y su sustrato establecida por Michaelis y Menten.

$$\mu = \mu_{máx} \frac{S}{K_S + S} \qquad \text{(Ecuación 6.7)}$$

Donde:

S = concentración de sustrato

$\mu_{máx}$ = velocidad específica de crecimiento máxima (a concentraciones de sustrato saturante $S >> K_s$)

K_S = constante de saturación que es numéricamente igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = ½\ \mu_{máx}$.

Valores de K_S bajos indican que existe una gran afinidad del microorganismo por el sustrato y en este caso μ_{max} no se verá afectada hasta agotar el sustrato, mostrando una fase IV de desaceleración corta.

1.1.4. Determinación de otros parámetros cinéticos

La concentración de células al finalizar la fase exponencial y entrar en fase estacionaria depende del **rendimiento del cultivo** (*Yx/s*) que está relacionada con la concentración de sustrato limitante:

$$Yx/s = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \qquad \text{(Ecuación 6.8)}$$

Donde:

ΔX = diferencia entre las concentraciones de biomasa final e inicial

ΔS = diferencia entre las concentraciones de sustrato final e inicial

El rendimiento se expresa como g de biomasa por g de sustrato y permite comparar el crecimiento con diferentes sustratos para seleccionar la fuente de carbono que permita

obtener una mayor biomasa. Además, relacionado a la velocidad de crecimiento, permite calcular la **velocidad específica de consumo de sustrato** (q_s) como sigue:

$$q_s = \frac{\mu}{Yx/s} \qquad \text{(Ecuación 6.9)}$$

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 concentración celular formada por unidad de tiempo que se calcula como:

$$P = \frac{X}{t} \qquad \text{(Ecuación 6.10)}$$

1.2. 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. Es, por lo tanto, un sistema abierto.

En estos sistemas, mediante la manipulación de los flujos de entrada (ingreso de medio fresco) y de salida (extracción de células, sustrato y producto), se establece un estado de equilibrio denominado **estado estacionario** que está influenciado por la velocidad de dilución (D) correspondiente con la velocidad específica de crecimiento. A diferencia del cultivo discontinuo, este sistema opera bajo condiciones en el cual todos los componentes (biomasa, sustrato y producto) del cultivo son constantes.

Es un sistema ideal para realizar estudios fisiológicos y para la optimización de medios de cultivo. Sin embargo, existe una mayor posibilidad de contaminación y de mutaciones de la cepa original.

1.3. Cultivo discontinuo alimentado

Un caso intermedio entre el cultivo discontinuo 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 sistema discontinuo, 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, de este modo, 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 más el adicionado durante la etapa de alimentación.

Estos sistemas son útiles para obtener altas densidades de biomasa (producción de levaduras para panificación) o cuando se produce alguna sustancia inhibidora (ácidos o alcoholes) que afectan el crecimiento celular.

2. Crecimiento de levaduras

2.1. Metabolismo de las levaduras-Efecto Crabtree

Las levaduras pueden ser categorizadas en varios grupos de acuerdo a sus modos de producción energética, utilizando respiración o fermentación (Tabla 6). Cabe señalar que estos procesos están 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 dependen de las condiciones de cultivo.

Tabla 6. Principales modos de respiración en levaduras.

Tipos de respiración	**Ejemplos**	**Respiración**	**Fermentación**	**Crecimiento anaeróbico**
Aerobia obligada	*Rhodotorula*, *Cryptococcus*	Si	No	No
Aerobia	*Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*	Si	anaeróbico[a]	No
Fermentadores aeróbicos	*Schizosaccharomyces pombe*	limitado	aeróbico y anaeróbico	No
Fermentadores aeróbicos facultativos	*S. cerevisiae*	limitado	aeróbico y anaeróbico	facultativo, requiere esteroles y ácidos grasos para crecer
Fermentadores obligados	*Torulopsis*	No	anaeróbico	Si

[a] En células previamente cultivadas.

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo con múltiples aplicaciones biotecnológicas (productor de etanol, biomasa, proteínas recombinantes y antibióticos). Además, es un organismo modelo por su alta homología con otras células eucariotas. 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. En esta levadura, la fermentación

alcohólica es una vía predominante en la degradación de los azúcares de hexosa a etanol y puede ocurrir en ausencia o en presencia de oxígeno. Dicha fermentación ocurre en aerobiosis cuando es cultivada en elevadas concentraciones de glucosa, dado que en estas condiciones el metabolismo del ciclo de Krebs está reprimido por el azúcar. La saturación de la glucólisis genera un desbordamiento de la concentración de piruvato que ingresa a la fermentación, aunque haya oxígeno disponible. Este fenómeno metabólico se define como **efecto Crabtree**. En base a este efecto, aquellas levaduras capaces de realizar respiración y fermentación alcohólica (producción de etanol) en presencia de oxígeno (aerobiosis) se denominan levaduras ***Crabtree positivas*** (*S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), mientras que si degradan el azúcar a CO_2 son ***Crabtree negativas***.

2.2. Efecto Crabtree y velocidad de crecimiento de *S. cerevisiae*

El fenómeno Crabtree ocurre a velocidades de crecimiento elevadas. En la producción de levadura de panificación el efecto Crabtree debe eliminarse o minimizarse debido a que la formación de subproductos fermentativos es un aspecto no deseado. En la práctica, es normalmente alcanzada mediante sistemas operando en sistemas discontinuo alimentado controlando la concentración de glucosa entre 0,1-0,25 g/l.

Frick y col. (2005) estudiaron que la contribución relativa de la fermentación alcohólica a la actividad metabólica general, aumenta con el incremento en la velocidad de crecimiento. Para determinar la influencia realizaron cultivos continuos en quimiostatos a distintas velocidades de dilución D de este modo determinaron que:

1) A velocidades de crecimiento de D = μ = 0,20 h^{-1}, el metabolismo de *S. cerevisiae* es puramente oxidativo con altos rendimientos en biomasa y ausencia de productos de fermentación.
2) A valores de D = μ = 0,30 h^{-1} cerca del 25 % de la glucosa utilizada es direccionada hacia la vía fermentativa, siendo aún la respiración oxidativa el principal metabolismo.
3) A valores de μ más elevados el efecto Crabtree es inducido, el cual se manifiesta por una formación incrementada de etanol, acetato y glicerol. Si la velocidad se incrementa a valores de D = μ = 0,40 h^{-1}, más del 50 % de la glucosa es canalizada a través de la vía fermentativa.

2.3. Crecimiento diáuxico en *S. cerevisiae*

Asimismo, el cultivo de *S. cerevisiae* en un sistema discontinuo puede causar un crecimiento diáuxico que se define como un crecimiento en el que pueden observarse dos fases exponenciales. Luego del consumo casi total de hexosas como glucosa a componentes de dos átomos de carbono (en particular etanol), cambia el metabolismo y la levadura utiliza el etanol formado como sustrato para ser degradado y obtener de él energía Este cambio metabólico es conocido como **cambio diáuxico** y puede ser empleado para mejorar la

eficiencia y economía en la producción de levaduras de panificación. El etanol presenta rendimientos más altos que las hexosas debido a su mayor grado de reducción y contribuye a disminuir la carga del efluente de la planta industrial.

Esto es posible gracias a una duplicación de la enzima citoplasmática, la alcohol deshidrogenasa (Adh). Existen dos genes que codifican Adh: el gen *adh*1 es expresado constitutivamente y codifica la formación de Adh1 que cataliza la conversión de acetaldehído a etanol, en tanto que el gen *adh*2 es expresado sólo cuando la concentración de azúcar se agota. Experimentalmente, la K_m de Adh1 es elevada para etanol, por lo tanto, su afinidad es baja, lo cual es consistente con qué etanol sea el producto de reacción. Mientras que, Adh2 tiene un K_m 10 veces menor, por lo cual su afinidad por etanol es lo suficientemente alta sugiriendo que esta enzima permite cambiar de dirección para tomar etanol y utilizarlo como sustrato en sentido inverso. Es así que se ha demostrado que la fermentación aeróbica que poseen las levaduras Crabtree positivas es el resultado de un proceso evolutivo ocurrido después de la duplicación de la enzima Adh.

BIBLIOGRAFÍA

Frick, O., Wittmann, C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative 13C flux analysis. *Microbial Cell Factory* 4, 30 (2005). https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-30

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. *Trends in genetics:* TIG, 22(4), 183–186. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

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).
3) Estimar parámetros cinéticos a partir de los resultados obtenidos a diferentes intervalos de tiempo.

PARTE PRÁCTICA

1. Condiciones de cultivo discontinuo

1) Cultivar *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* sp. en tubos de agar inclinado con medio levadura-peptona-dextrosa (10-10-30 g/l) e incubar a 25 - 30 °C durante 24-48 horas.
2) Colocar 7 ml de caldo levadura-peptona-dextrosa (pH 5,3) en cada tubo, arrastrar la biomasa con un ansa en anillo y trasvasar la suspensión a un tubo de ensayo. Ambas suspensiones así preparadas se utilizan como inóculo inicial.
3) Inocular al 2% *v/v* cada levadura en un Erlenmeyer provisto de deflectores con 45 ml del caldo mencionado.
4) Incubar a 30 °C en agitador orbital a 200 rpm. Tomar alícuotas cada 2 horas para realizar las determinaciones de biomasa, sustrato y producto. Para realizar las determinaciones de glucosa y etanol se deben centrifugar alícuotas del cultivo y utilizar los sobrenadantes.

Los estudiantes realizarán la determinación en un punto y luego se le suministrarán el resto de los resultados para realizar las gráficas y determinar la velocidad de crecimiento.

2. Determinación de concentración celular (x)

2.1. Densidad óptica (método indirecto)

Se determina la densidad óptica a 580 nm ($D.O._{580\ nm}$) frente a un blanco de caldo YPD estéril. Cuando la absorbancia registrada sea mayor a 0,8 deberán hacerse diluciones de la muestra con caldo de cultivo y volver a medir. No olvidar tener en cuenta la dilución luego al hacer cálculos.

2.2. Determinación de peso seco (método directo)

Se determina biomasa inicial y final por la técnica de peso seco de acuerdo al procedimiento descrito en el trabajo práctico de cuantificación del crecimiento microbiano.

La biomasa inicial se determina en 5 ml del inóculo inicial, en vez de determinarlo en el Erlenmeyer, ya que este último no adquiere aún la concentración mínima necesaria para ser procesado por peso seco.

$$5\ ml\ inóculo \rightarrow A\ g\ biomasa$$

$$0{,}9\ ml\ inóculo \rightarrow B\ g\ biomasa$$

Ahora, esta biomasa contenida en los 0,9 ml de inóculo pasa a estar en el recipiente de cultivo que ya tiene otros 45 ml de caldo.

$$45{,}9\ ml\ caldo \rightarrow B\ g\ biomasa$$

$$1000\ ml\ caldo \rightarrow X_0\ g\ biomasa\ inicial$$

La biomasa final se determina directamente del Erlenmeyer de cultivo con un cálculo equivalente al visto en el trabajo práctico N° 6: Determinación de crecimiento microbiano.

3. Determinación de glucosa (sustrato S)

➔ *Fundamento*

La glucosa se determina mediante un **ensayo enzimático** con glucosa oxidasa (GOD), que oxida la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El H_2O_2, en presencia de peroxidasa (POD), produce la copulación oxidativa de fenol y 4-aminofenazona, formando un cromógeno rojo-cereza con una absorbancia máxima a 505 nm.

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} \text{ácido glucónico} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminofenazona} + \text{fenol} \xrightarrow{POD} \text{4-(p-benzoquinona-monoimino fenazona)} + 4H_2O$$

➔ *Procedimiento*

1) Utilizar un Kit de Glucemia comercial: en tres tubos de hemólisis colocar los siguientes volúmenes (Tabla 7).

Tabla 7. Preparación de blanco, estándar y muestra

	Estándar	**Muestra**	**Blanco**
Estándar	30 µl	-	-
Muestra	-	30 µl	-
Reactivo de Trabajo	3 ml	3 ml	3 ml

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

➔ *Cálculos*

Determinar la concentración de glucosa en gramos por litro, con la siguiente ecuación:

$$Glucosa\ (g/l) = A_M/A_E \times C_{EG}$$

Donde,

A_M: absorbancia de la muestra

A_E: absorbancia del estándar

C_{EG}: concentración del estándar de glucosa (1 g/l)

Si la concentración resultante es mayor a 4,5 g/l, es necesario diluir el contenido del tubo con reactivo de trabajo y volver a medir. La dilución deberá ser tenida en cuenta al realizar el cálculo.

4. Determinación de etanol (producto P)

➔ *Fundamento*

El etanol es determinado por el **método de microdifusión** utilizando una celda de difusión de Conway. El etanol es liberado de la muestra de cultivo (en el área más externa de la cámara) por una solución saturada de carbonato de potasio, difunde al área central y allí es oxidado por una solución sulfúrica de dicromato de potasio. La reacción se evidencia por el cambio de naranja a verde azulado producto de la reducción del dicromato.

$$3C_2H_5OH + 8H_2SO_4 + 2K_2Cr_2O_7 \rightarrow 3CH_3COOH + 2Cr(SO_4)_3 + 11H_2O + 2K_2SO_4$$

Esta técnica se hace cuantitativa trabajando con un blanco de solución de dicromato de potasio y un estándar o testigo de concentración conocida de etanol (1 g/l). Finalmente se hace determinación espectrofotométrica a 500 nm permite conocer indirectamente para la determinación de etanol en diversas muestras (cultivos microbianos, sangre, orina, suero o tejido homogeneizado).

➔ *Procedimiento*

1) Preparar una celda de Conway para cada cultivo (*Rhodotorula sp* y *S. cerevisiae*) y una para el estándar (Figura 32). Colocar en cada caso:
   a) Círculo central: 2 ml de solución naranja sulfúrica de dicromato de potasio.
   b) Círculo externo: 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio + 1 ml de cultivo o estándar.
   c) Sellar todas las celdas con un vidrio con vaselina y permitir la difusión del etanol 1 h a 37 °C o 3 h a temperatura ambiente.
2) Luego de la incubación, transferir el volumen de la cámara central en forma cuantitativa (lavando la cámara con agua destilada) y recoger en una probeta graduada de 10 ml y llevar a volumen con agua destilada.
3) Preparar en una probeta un blanco con 2 ml de solución sulfúrica de dicromato de potasio y llevar a 10 ml con agua destilada.
4) Determinar las absorbancias de la muestra, el estándar y el blanco a 500 nm.

Importante: esta determinación es indirecta, es decir el blanco (naranja) tendrá la mayor absorbancia a esa longitud de onda, mientras que si hay etanol (verde azulado) la absorbancia se reduce.

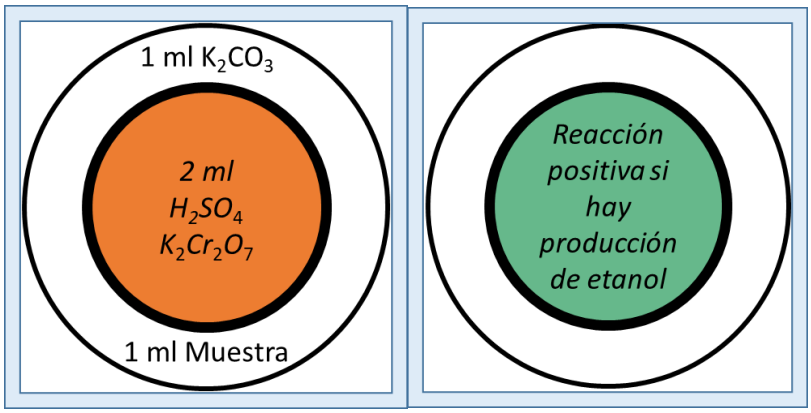


Figura 32. Celda de difusión de Conway: carga de la celda con los reactivos (izquierda), reacción positiva en presencia de etanol (derecha). Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

➔ *Cálculos*

$$Etanol\ (g/l) = \frac{A_B - A_D}{A_B - A_E} \times C_{EE}$$

Donde

A_B: absorbancia del blanco de dicromato de potasio

A_D: absorbancia de la muestra o desconocido

A_E: absorbancia del estándar de etanol

C_{EE}: concentración del estándar de etanol (1 g/l)

PRÁCTICO DE AULA

1) Utilizar una planilla de cálculo de Excel o similar para cargar los datos obtenidos en cada tiempo.
2) Graficar con gráficos de dispersión el crecimiento celular de ambas levaduras (x), el consumo de glucosa (S) y la producción de etanol (P).
3) Reconocer la fase exponencial y transformar los datos de DO_{580nm} a logaritmo natural y graficar Ln DO vs tiempo.
4) Obtener de la regresión lineal la ecuación de la recta y determinar $\mu_{máx}$ *(pendiente)*.
5) Calcular el tiempo de generación (t_g).
6) Calcular el rendimiento Y para cada caso teniendo en cuenta los valores de peso seco al inicio y al final del cultivo
7) Interpretar la producción de biomasa y de etanol en ambas levaduras en las condiciones de cultivo establecidas.

Además, se brindarán oportunamente otros ejercicios extra para comprender los parámetros cinéticos.

8 Enfermedades infecciosas

OBJETIVOS

1) Familiarizarse con las características y clasificación de las enfermedades infecciosas.
2) Comprender los conceptos generales más importantes referidos a infecciones, mediante su aplicación en infecciones concretas, ya sean clásicas o emergentes.
3) Entender los postulados de Koch clásicos y moleculares para determinar los agentes causales de una enfermedad infecciosa.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Interacciones microbianas en humanos

Los procariotas, especialmente las bacterias, son abundantes en el cuerpo humano, superando en número a las células humanas, aunque la proporción exacta varía según los estudios. El conjunto de microorganismos que colonizan un área particular del cuerpo, como la boca, el tracto gastrointestinal, la piel, los oídos y el aparato genital, se denomina microbiota.

Las interacciones entre el ser humano y los procariotas pueden ser beneficiosas o perjudiciales, o no tener efecto en una o ambas especies involucradas. Las enfermedades infecciosas constituyen una forma de parasitismo (Tabla 8). Menos del 1% de los procariotas pueden causar infecciones o enfermedades y se conocen como **patógenos** que también pueden contaminar alimentos y medicamentos, planteando preocupaciones sanitarias.

Tabla 8. Tipos de relaciones simbióticas

Tipo	Población A	Población B
Mutualismo	Beneficiado	Beneficiado
Amensalismo	Dañado	No afectado
Comensalismo	Beneficiado	No afectado
Neutralismo	No afectado	No afectado
Parasitismo	**Beneficiado**	**Dañado**

2. Características de las enfermedades infecciosas

Una **infección** es la colonización de un hospedador por un patógeno celular (bacterias, parásitos y hongos) o acelular (virus, viroides y priones), que puede llevar, en ciertos casos, a causar una **enfermedad infecciosa,** dañando la estructura y/o funciones del cuerpo. Dicha enfermedad se manifiesta por cambios en los signos vitales (temperatura corporal, frecuencia respiratoria, entre otros) y síntomas que el personal de salud utilizará para el diagnóstico. En muchos casos, los síntomas son subjetivos y pueden ser similares para varias enfermedades

complicando así el diagnóstico. Por ejemplo, un individuo que presenta síntomas de diarrea, puede haber sido infectado por bacterias (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, cepas de *E. coli* enteropatógenas o enterohemorrágicas); virus (norovirus y rotavirus) o parásitos (*Entamoeba histolytica, Giardia duodenalis)*. Sin embargo, algunas infecciones pueden ser asintomáticas causando **enfermedades subclínicas** que no presentan signos notables o síntomas, como ocurre en las infecciones por el virus del herpes simple.

3. Períodos de la enfermedad infecciosa

En una enfermedad infecciosa se presentan cinco períodos (Figura 33):

1) **Período de incubación:** ocurre después de la entrada del patógeno en el hospedador. Es durante este tiempo que el patógeno comienza a multiplicarse, sin embargo, hay un número insuficiente de partículas de patógenos (células o virus) presentes para causar signos y síntomas de la enfermedad. Los períodos de incubación pueden variar entre días, semanas, meses o años dependiendo del patógeno. Los factores involucrados en la determinación de la duración del período de incubación incluyen:
    - ➢ La virulencia o agresividad del patógeno
    - ➢ El estado del sistema inmune del hospedador
    - ➢ El sitio de infección
    - ➢ El tipo de infección
    - ➢ El tamaño de la dosis infecciosa recibida.

    Durante este período el paciente no es consciente de que una enfermedad está comenzando a desarrollarse.
2) **Período prodrómico:** ocurre después del período de incubación. Durante esta fase, el patógeno continúa multiplicándose y el hospedador comienza a experimentar signos y síntomas generales, que usualmente activan el sistema inmunitario pudiendo causar fiebre, dolor, hinchazón y/o inflamación. Por lo general, tales signos y síntomas son demasiado generales para diagnosticar una enfermedad particular.
3) **Período de enfermedad:** ocurre después del período prodrómico, los signos y síntomas de la enfermedad son más evidentes, específicos y en algunos casos también más graves.
4) **Período de declinación**: continúa luego del período de enfermedad, en esta fase el número de partículas de patógenos comienza a disminuir, al igual que los signos y síntomas de la enfermedad. Sin embargo, los pacientes pueden volverse susceptibles a desarrollar **infecciones secundarias** porque sus sistemas inmunitarios se han debilitado por la **infección primaria.**
5) **Período de convalecencia**: es la etapa final, el paciente generalmente vuelve a las

funciones normales, aunque algunas enfermedades pueden causar daños permanentes que el cuerpo no puede reparar por completo.

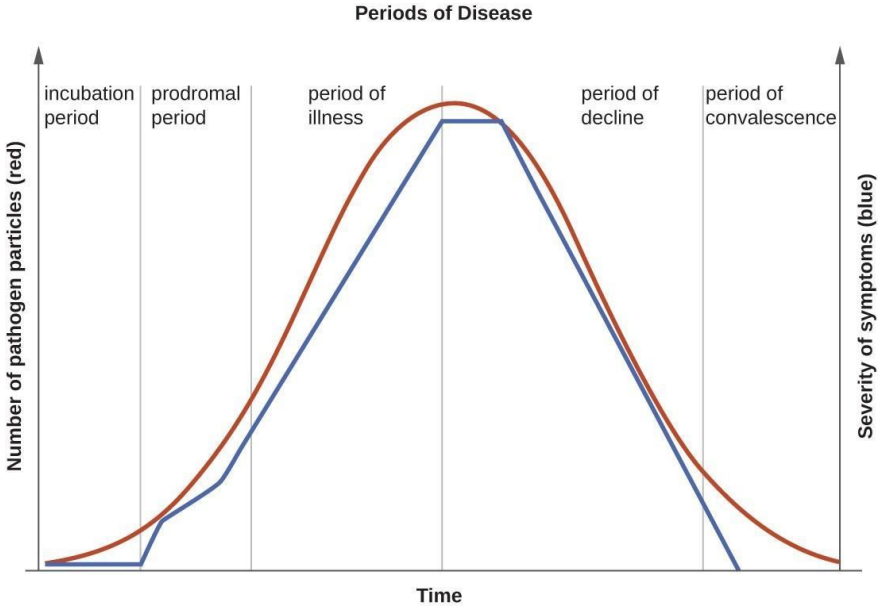


Figura 33. Períodos de progresión de una enfermedad infecciosa en relación con el número de partículas de patógenos (curva roja) y la gravedad de los signos y síntomas (curva azul). Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

La transmisibilidad de las enfermedades infecciosas varía según el agente causal y el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, los pacientes con meningitis bacteriana son contagiosos desde el período de incubación. Mientras que, en la meningitis viral, la contagiosidad comienza con los primeros síntomas (periodo prodrómico). La transmisión puede continuar incluso durante los períodos de declinación, convalecencia y, en algunos casos, en un **estado de portador**, que puede durar años.

4. Clasificaciones de enfermedades infecciosas

A diferencia de otras enfermedades, las enfermedades infecciosas son **transmisibles entre personas** y su grado de transmisibilidad generalmente depende del patógeno. Sin embargo, también existen enfermedades infecciosas **no transmisibles**, como el tétanos (*Clostridium tetani*), la histoplasmosis (hongo *Histoplasma capsulatum*), la legionelosis (*Legionella pneumophila*) que no se propagan entre personas.

Según el lugar donde se adquirió la infección, las enfermedades podrán ser:

1) **Iatrogénicas:** son causadas por procedimientos médicos como tratamientos de heridas, cateterismo o cirugías cuando el sitio afectado se contamina. Por ejemplo, la fascitis necrotizante causada por la contaminación de vendajes con *Clostridium perfringens* u otras bacterias que pueden causar esta afección.

2) **Asociadas al cuidado de la salud:** son adquiridas en establecimientos de salud a través de equipos médicos esterilizados incorrectamente, sábanas, botones de llamada, picaportes, o por parte del personal sanitario que no se lavan las manos o que no se cambian los guantes. Además, muchos de los pacientes hospitalizados tienen sistemas inmunitarios debilitados, haciéndolos más susceptibles a las infecciones.
3) **Comunitarias:** son adquiridas en la vida diaria: colegios, restaurantes, transporte público, entre otros.

Por otra parte, las **enfermedades zoonóticas** se transmiten al humano a través de vectores animales como mamíferos (rabia transmitida por perros, gatos, zorros, murciélagos infectados con el virus) o artrópodos (dengue, zika, chikungunya, malaria transmitida por mosquitos infectados por virus).

Según la duración del período de enfermedad las enfermedades serán:

1) **Agudas:** los síntomas se desarrollan en un tiempo relativamente corto (horas, días o algunas semanas) e implican un inicio rápido de las condiciones de la enfermedad como en el caso de la gripe (virus influenza) que dura aproximadamente 1 semana.
2) **Crónicas:** los cambios patológicos pueden ocurrir durante períodos de tiempo más largos (meses, años o toda la vida) como es el caso de la gastritis crónica por *Helicobacter pylori* que persiste en el ambiente ácido al producir la enzima ureasa, que modifica la acidez local, permitiendo que las bacterias sobrevivan. En consecuencia, las infecciones pueden reaparecer indefinidamente a menos que sea tratada con antibióticos.
3) **Latentes:** el patógeno permanece inactivo durante períodos prolongados de tiempo sin replicarse y se reactivan como el herpes bucal y genital (virus herpes simplex), la varicela infantil que se reactiva causando culebrilla en la adultez (virus varicela-zoster) y la mononucleosis causada por el virus Epstein-Barr. Los dos primeros evaden el sistema inmunitario del hospedador residiendo dentro de las células del sistema nervioso para convertirse en infecciones activas durante momentos de estrés e inmunosupresión.

5. Postulados de Koch

Para la mayoría de las enfermedades infecciosas, la capacidad de identificar con precisión el patógeno causal es un paso crítico para encontrar o definir tratamientos efectivos. El médico Robert Koch en 1884 ideó un enfoque sistemático para confirmar las relaciones causales entre enfermedades y patógenos específicos. Mediante ensayos en animales de laboratorio sanos y enfermos se establecen cuatro postulados que deben cumplirse para determinar positivamente si un microorganismo específico fue la causa de una enfermedad particular (Figura 34).

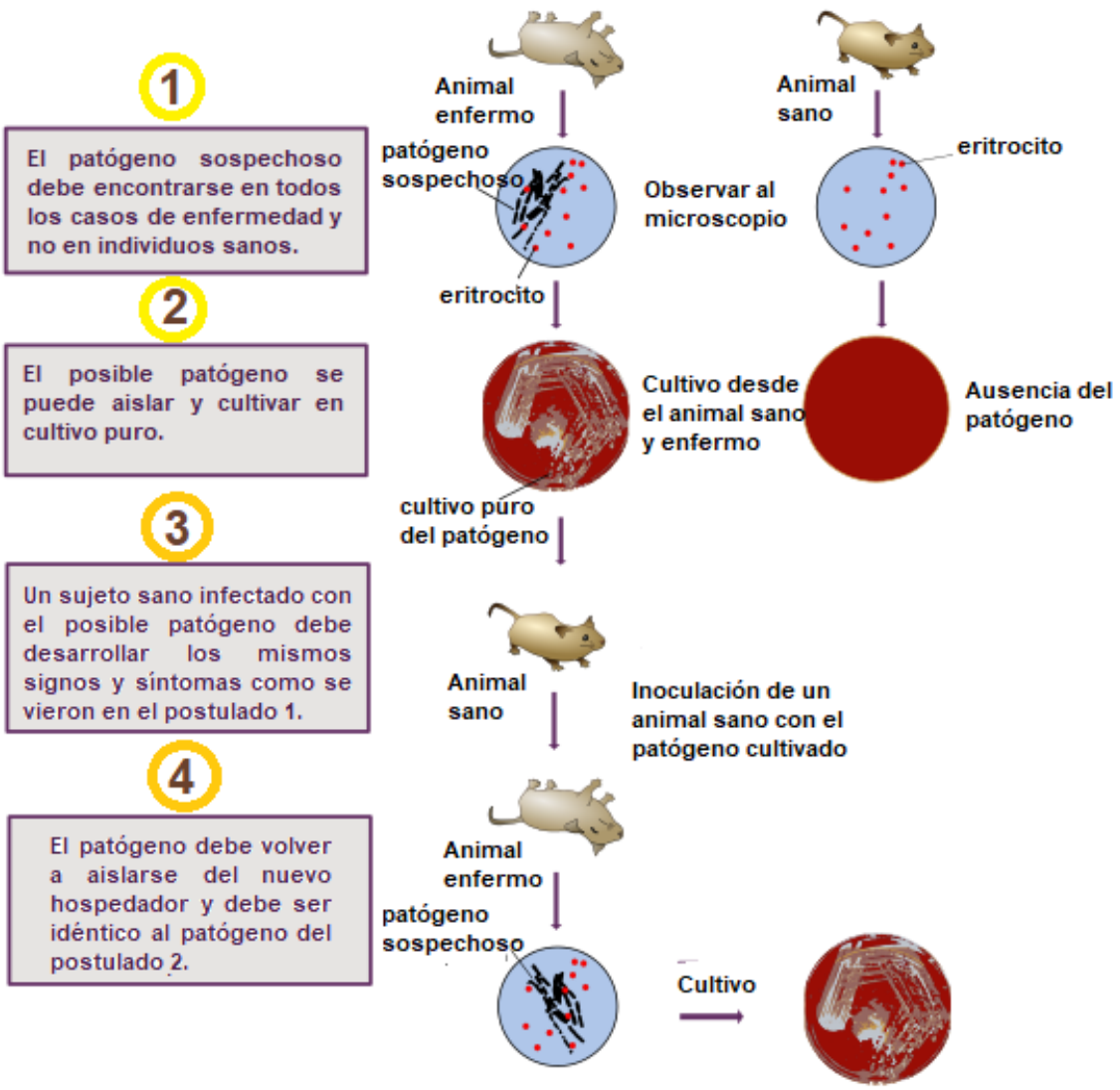


Figura 34. Esquema de los pasos a seguir para confirmar que un patógeno es la causa de una enfermedad en particular (derecha), usando los cuatro postulados de Koch (izquierda). Nota. Imagen de Mike Jones. Licencia CC-BY-SA 3.0. Wikimedia Commons. Traducida por Farm. Mariana Cozzolino. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koch%27s_Postulates.svg.

Los postulados de Koch siguen siendo fundamentales para entender las causas de las enfermedades, pero con los avances en microbiología se han revelado limitaciones. Por ejemplo, *H. pylori* puede causar gastritis crónica, pero también puede estar presente en la microbiota de personas sanas sin causar enfermedad contradiciendo el primer postulado. Además, Koch asumió que todos los individuos son igualmente susceptibles a las enfermedades, ignorando factores como la microbiota y el sistema inmunitario que, ahora se sabe, influyen en la susceptibilidad. También, supuso que todos los patógenos pueden cultivarse en cultivo puro, lo cual no es siempre cierto, especialmente con patógenos

intracelulares obligados, *Treponema pallidum* (causal de la sífilis) y que los animales pueden ser modelos confiables para enfermedades humanas, lo cual no es cierto en el SIDA, que solo afecta a los humanos. Debido a estas limitaciones, en 1988, Stanley Falkow propuso los postulados moleculares de Koch (Tabla 9 columna izquierda) cuya premisa está en identificar un gen que puede causar que el organismo sea patógeno.

Las modificaciones de Falkow a los postulados originales de Koch explican no solo las infecciones causadas por patógenos intracelulares, sino también la existencia de cepas patógenas de organismos que generalmente no son patógenos. Por ejemplo, la forma predominante de la bacteria *E. coli* es un miembro de la microbiota normal del intestino humano y generalmente es considerado inofensivo. Sin embargo, existen cepas patógenas conocidas como *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) que resultaron de cambios genéticos menores que les permiten producir toxinas y causar enfermedad.

Tabla 9. Postulados moleculares de Koch aplicados a STEC

Postulados de Koch molecular	**Aplicación a STEC**
(1) El fenotipo (signo o síntoma de enfermedad) debe asociarse sólo con cepas patógenas de una especie.	(1) STEC causa inflamación intestinal y diarrea, mientras que cepas no patógenas de *E. coli* no.
(2) La inactivación de los genes asociados con la patogenicidad debe resultar en una pérdida medible de patogenicidad.	(2) El gen que codifica la producción de toxina Shiga en STEC se inactiva reduciendo la capacidad de causar enfermedad.
(3) La reversión del gen inactivo debería restablecer el fenotipo de la enfermedad.	(3) Al agregar el gen que codifica la toxina nuevamente en el genoma (por ejemplo, con un fago o plásmido), se restaura la capacidad de STEC de enfermar.

Los postulados moleculares de Koch también tienen limitaciones. Por ejemplo, la manipulación genética de algunos patógenos no es posible utilizando los métodos actuales de genética molecular. También, algunas enfermedades no tienen modelos animales adecuados, lo que limita la utilidad de los postulados originales y moleculares.

6. Patogenicidad y Virulencia

La **patogenicidad** es la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad, mientras que la **virulencia** es el grado de esa capacidad, variando desde organismos avirulentos (no dañinos) que causan síntomas leves o infecciones asintomáticas hasta altamente virulentos que provocan enfermedades graves, como *Bacillus anthracis* cuando se inhalan las esporas que luego germinan desarrollando una infección activa y la enfermedad del ántrax. La bacteria libera al torrente sanguíneo toxinas potentes que causan edema,

hipoxia y necrosis, pero si un gen (o genes) involucrado en la patogénesis está inactivo, las bacterias se vuelven menos virulentas o no patógenas.

La virulencia se cuantifica mediante la **dosis infectiva media (DI50)** y la **dosis letal media (DL50)**, que indican respectivamente, la cantidad de patógenos o toxinas necesarios para infectar o matar al 50% de los animales inoculados en un experimento controlado.

Para calcular estos valores, cada grupo de animales es inoculado con una cantidad dentro de un rango de números conocidos de células patógenas o viriones. Al representar gráficamente el porcentaje de animales que han sido infectados o muertos vs. la concentración de patógenos inoculados se podrá calcular DI50 o DL50, respectivamente (Figura 35).

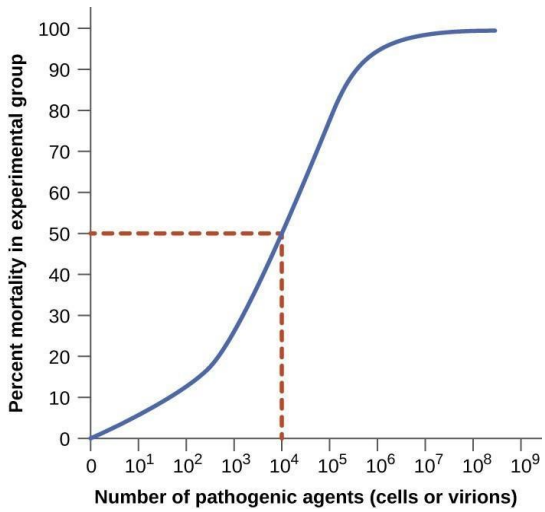


Figura 35. Determinación de DL50 graficando concentración de patógenos inoculados versus el porcentaje de animales de prueba infectados que murieron. En este ejemplo, la DL50 = 10^4 células patogénicas o viriones. Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

6.1. Patógenos primarios versus patógenos oportunistas

Los patógenos se pueden clasificar en primarios y oportunistas. Los **patógenos primarios** pueden causar enfermedades en cualquier persona, independientemente de su sistema inmunitario y su microbiota, como la *E. coli* productora de toxina *Shiga* que provoca diarrea hemorrágica (síndrome urémico hemolítico). Los **patógenos oportunistas** sólo causan enfermedades cuando las defensas del hospedador están comprometidas, como los ancianos, mujeres embarazadas, pacientes que reciben quimioterapia, con inmunodeficiencias (como el SIDA), que se están recuperando de una cirugía o que han sufrido heridas o quemaduras graves. Un ejemplo es *S. epidermidis*, que, aunque es parte de la microbiota normal de la piel, puede causar infecciones graves como endocarditis cuando ingresa al paciente a través de dispositivos biomédicos (catéteres, sondas, implantes). Otros casos incluyen microbios que causan enfermedades cuando cambian de ubicación en el

cuerpo, como *E. coli* que pasa del intestino grueso al sistema urinario provocando infecciones, o *Candida* que sobrecrecen y puede causar infecciones bucales y vaginales (candidiasis) después de administrar antibióticos que alteran la microbiota normal del intestino.

6.2. Etapas de la patogenia

Para causar la enfermedad, un patógeno debe lograr con éxito cuatro etapas de patogénesis: exposición, adhesión (colonización), invasión e infección. El patógeno debe poder ingresar al hospedador, viajar a la ubicación donde puede establecer una infección, evadir o superar la respuesta inmune del hospedador y causar daños (es decir, enfermedad) al hospedador. En muchos casos, el ciclo se completa cuando el patógeno sale del hospedador y se transmite a un nuevo hospedador.

6.2.1. Exposición

Un encuentro con un posible patógeno se conoce como **exposición** o **contacto**. Los alimentos y los objetos que manejamos son formas en que podemos entrar en contacto con posibles patógenos. Sin embargo, no todos los contactos resultan en infección y enfermedad. Para que un patógeno cause enfermedad, necesita poder acceder al tejido del hospedador. Un sitio anatómico a través del cual los patógenos pueden pasar al tejido del hospedador se llama **portal de entrada** y están en contacto directo con el entorno externo (Figura 36).

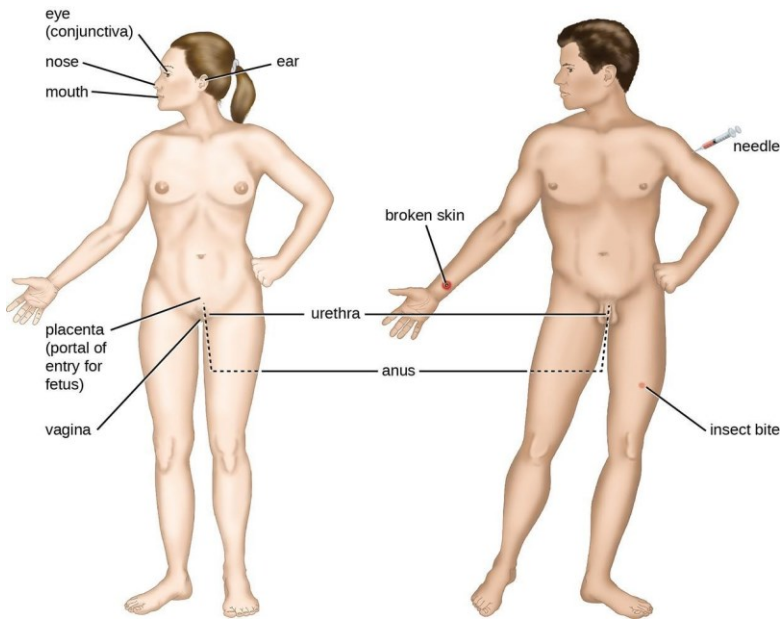


Figura 36. Diferentes portales de entrada y salida por los cuales los patógenos ingresan y egresan del cuerpo. Con la excepción de la placenta, muchas de estas localizaciones están expuestos directamente al exterior. Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

6.2.2. Adhesión

Después de la exposición inicial, los patógenos se adhieren a las células en el portal de entrada utilizando factores de adhesión. Las adhesinas (gluco o lipoproteínas), moléculas presentes en la superficie de los patógenos, se unen a receptores específicos en las células del hospedador. Estas adhesinas pueden encontrarse en fimbrias, flagelos, cilios, membranas y cápsides víricas. Algunos patógenos bacterianos producen glucocálix para formar cápsulas, capas mucosas o biopelículas. Las biopelículas les permiten adherirse a las células, dificultando la eliminación del patógeno por parte del hospedador y protegiendo a las bacterias del sistema inmunitario y los antibióticos, lo que complica su tratamiento. También, se adhieren a superficies de dispositivos biomédicos dificultando los procesos de desinfección.

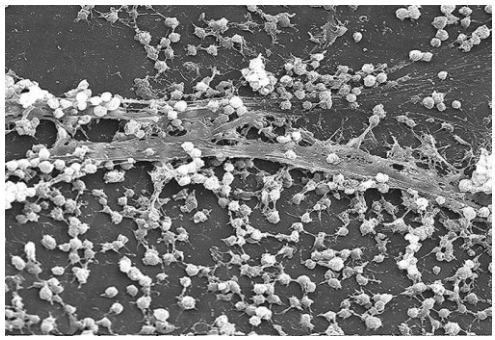


Figura 37. Glucocálix producido por las bacterias formadoras de biopelícula sobre la superficie de un catéter. Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

6.2.3. Invasión

Una vez que la adhesión es exitosa, la **invasión** puede iniciar diseminando al patógeno a través de tejidos. La producción de exoenzimas (**factores de virulencia)** le permite colonizar y dañar los tejidos del hospedador a medida que se extienden y lo protegen del sistema inmunitario (Figura 38).

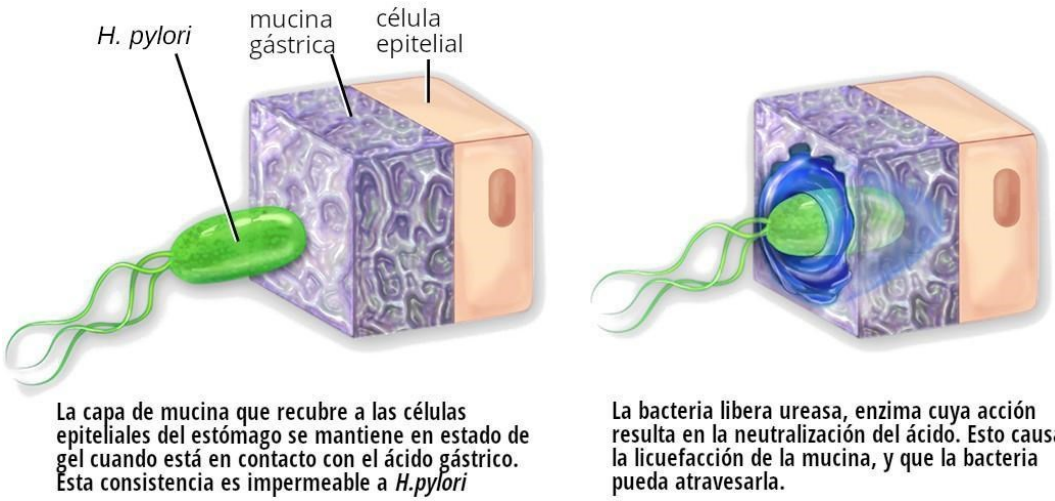


Figura 38. Invasión de *Helicobacter pylori* en las células epiteliales de la mucosa gástrica. Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

Los patógenos intracelulares logran la invasión al ingresar a las células del hospedador y reproducirse evadiendo algunos mecanismos del sistema inmunitario y aprovechando los nutrientes. Algunos son patógenos intracelulares obligados (sólo pueden reproducirse dentro de las células del hospedador Chlamydia, Rickettsia) y otros son patógenos intracelulares facultativos (pueden reproducirse dentro o fuera de dichas células Legionella).

La entrada a una célula puede ocurrir por **endocitosis** mediante dos mecanismos. Un mecanismo se basa en la **secreción de proteínas efectoras,** las cuales son excretadas al exterior y desencadenan en la célula diana (célula del hospedador) una respuesta de endocitosis, haciendo que la célula del hospedador termine englobando al patógeno y llevándolo hacia su interior (este es el método que usan *Salmonella* y *Shigella* cuando invaden el epitelio intestinal). El segundo mecanismo se basa en el contacto proteína-proteína, en el cual el patógeno posee proteínas de superficie denominadas **invasinas** que se unen a los receptores específicos en la célula del hospedador provocando la entrada (por ejemplo, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*).

Los leucocitos y otros fagocitos del sistema inmunitario, introducen patógenos por endocitosis activa, en un proceso llamado **fagocitosis**. Aunque la fagocitosis permite que el patógeno ingrese a la célula del hospedador, en la mayoría de los casos, la célula del hospedador mata y degrada el patógeno mediante el uso de enzimas digestivas. Normalmente, cuando un patógeno es ingerido por un fagocito, queda encerrado dentro de un fagosoma en el citoplasma; que luego se fusiona con una lisosoma para formar un fagolisosoma, donde las enzimas digestivas matan al patógeno. Sin embargo, algunos patógenos intracelulares, como *L. monocytogenes* y *Shigella* producen proteínas que lisan el fagosoma, antes de que se fusione con el lisosoma, permitiendo que las bacterias escapen al citoplasma del fagocito donde pueden multiplicarse. Otras bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *L. pneumophila* y *Salmonella* evitan la fusión del fagosoma con el lisosoma, quedando vivas y dividiéndose dentro del mismo fagosoma.

6.2.4. Infección

Después de la invasión, la multiplicación exitosa del patógeno conduce a la infección. Las infecciones pueden describirse como locales, focales o sistémicas, dependiendo de la extensión de la infección. Una **infección local** se limita a un área pequeña del cuerpo, típicamente cerca del portal de entrada. Por ejemplo, un folículo piloso infectado con *S. aureus* puede resultar en un forúnculo alrededor del sitio de infección. En una **infección focal**, un patógeno localizado, o las toxinas que produce, pueden propagarse a una ubicación secundaria. Por ejemplo, un dentista que lastima la encía con una herramienta afilada puede provocar una infección local en la encía por las bacterias *Streptococcus* spp. de la microbiota oral normal. Estos cocos, luego pueden acceder al torrente sanguíneo y por esta vía a otras

ubicaciones en el cuerpo, lo que resulta en una infección secundaria. Por último, cuando una infección se disemina por todo el cuerpo, la llamamos **infección sistémica**. Por ejemplo, la infección por el virus varicela-zoster típicamente entra a través de una membrana mucosa del sistema respiratorio superior. Entonces se extiende por todo el cuerpo, dando como resultado las clásicas lesiones rojas de la piel asociadas con la varicela. Estas lesiones no son los sitios de infección inicial, son signos de una infección sistémica.

A veces, una **infección primaria**, la infección inicial causada por un patógeno, puede conducir a una **infección secundaria** por otro patógeno. Por ejemplo, el sistema inmunitario de un paciente con una infección primaria por VIH se ve comprometido, haciendo que el paciente sea más susceptible a enfermedades secundarias como la candidiasis oral y otras causadas por patógenos oportunistas. La terapia con antibióticos dirigida al patógeno primario puede causar daños colaterales a la microbiota normal, creando una apertura para patógenos oportunistas.

6.2.5. Transmisión de la enfermedad

Para que un patógeno persista, debe estar en condiciones de ser transmitido a un nuevo hospedador, dejando al hospedador infectado a través de un portal de salida. Al igual que con los portales de entrada, muchos patógenos están adaptados para usar un portal particular de salida. Los portales de salida más comunes incluyen la piel y las vías respiratorias, urogenitales, y tractos gastrointestinales. Toser y estornudar puede expulsar a los patógenos del tracto respiratorio. Un solo estornudo puede enviar miles de partículas de virus al aire. Las secreciones y excreciones pueden transportar patógenos fuera de otros portales de salida. Las heces, la orina, el semen, las secreciones vaginales, las lágrimas, el sudor y las células de la piel pueden servir como vehículos de salida para determinados patógenos. Los que dependen de insectos vectores para la transmisión, salen del cuerpo en la sangre extraída por el insecto al picar. Del mismo modo, algunos patógenos salen del cuerpo en la sangre extraída por agujas.

BIBLIOGRAFÍA

Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. y Mietzner, T. A. (2015). *Jawetz, Melnick y Adelberg. Medical Microbiology.* 27ª Edición. Mc Graw Hill LLC.

Parker, N., Schneegurt, M., Thi Tu, A., Lister, P. y Forster B. M. (2016). *Microbiology.* Houston, Texas: OpenStax. Openstax books Microbiology Chapter 15

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2017). *Introducción a la microbiología*. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Desarrollar habilidades profesionales transversales relacionadas con la comunicación entre pares y divulgación.
2) Lograr un trabajo colaborativo grupal para diseñar presentaciones.
3) Exponer conocimientos oralmente de manera clara y efectiva.

PARTE PRÁCTICA

1. Modalidad del seminario

Se desarrollarán seminarios a partir del material bibliográfico proporcionado por los docentes y de la consulta de otras fuentes adicionales que pueda seleccionar cada grupo.

Se expondrán presencialmente en grupos, en un **tiempo aproximado de 10 minutos** por seminario. Los grupos serán generados aleatoriamente desde el aula virtual y los temas serán luego sorteados entre los grupos.

Los integrantes de cada grupo deberán realizar colaborativamente una investigación bibliográfica, siguiendo las sugerencias de los docentes. Con la información recabada diseñarán una presentación de Google, que será compartida por los docentes, Dicha presentación debe reflejar el trabajo colaborativo, de comprensión y síntesis de la lectura del material bibliográfico investigado, y la vinculación con los contenidos teóricos correspondientes.

La presentación deberá cumplir con la siguiente estructura:

1) Portada: debe incluir Número y nombre del TP, tema e integrantes.
2) Descripción de la enfermedad con sus signos y síntomas.
3) Descripción del/los microorganismo/s implicado/s, incluyendo sus factores de virulencia.
4) Vías de transmisión.
5) Métodos diagnósticos más habituales
6) Medidas de prevención.
7) Tratamiento: nombre genérico, posología y algunas marcas comerciales.

2. Evaluación

Se realizará en forma grupal, aplicando la rúbrica provista oportunamente. Finalizada la exposición se realizará un coloquio de preguntas. Ambas actividades deberán ser satisfactorias para aprobar el trabajo práctico.

9 Evaluación de la actividad antibacteriana de biocidas

OBJETIVOS

1) Comprender la función, clasificación y aplicación de los biocidas.
2) Identificar los factores que influyen en su eficacia antimicrobiana.
3) Familiarizarse con los distintos ensayos para evaluar la eficacia antimicrobiana de los biocidas.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Definición de compuestos biocidas

Los **biocidas** son agentes químicos capaces de inactivar o inhibir el crecimiento microbiano. Si bien algunos de ellos en ciertas concentraciones y condiciones pueden actuar como agentes esterilizantes (glutaraldehído, formol, peróxido de hidrógeno), en general la mayoría se emplean para reducir las poblaciones microbianas a niveles seguros.

Debido a su acción antimicrobiana pueden emplearse con tres funciones principales:

1) **Antisépticos**: compuestos cuya toxicidad reducida permite su uso sobre la piel y tejidos vivos. Ejemplo: clorhexidina, yodopovidona.
2) **Conservantes**: compuestos que se adicionan a alimentos o medicamentos para retardar su deterioro por la contaminación microbiana. Ejemplo: benzoato de sodio, parabenos, cloruro de benzalconio.
3) **Desinfectantes**: compuestos antimicrobianos que se utilizan para eliminar microorganismos presentes en superficies u objetos inanimados. La contaminación microbiana en ámbitos industriales, farmacéuticos y hospitalarios, puede llevar a contaminaciones de superficies y productos que en definitiva pueden terminar en procesos infecciosos en pacientes. Estas dificultades se reducen al mínimo a través de programas de limpieza, sanitización y desinfección, utilizando este tipo de agentes. Ejemplos: derivados fenólicos, compuestos de amonio cuaternario, tensioactivos.

2. Clasificación de biocidas

Los biocidas se clasifican según el nivel de acción en bajo, medio y alto de acuerdo a los distintos tipos de microorganismos que eliminan. Todos los biocidas de los tres niveles actúan contra formas vegetativas (bacterias y hongos) y virus lipídicos. Los de nivel medio, además, eliminan micobacterias y virus no lipídicos. Finalmente, las esporas bacterianas sólo son

eliminadas por biocidas de alto nivel (Figura 39). Algunos biocidas pueden cambiar de nivel dependiendo la concentración a la que se utilice, como es el caso del cloro.

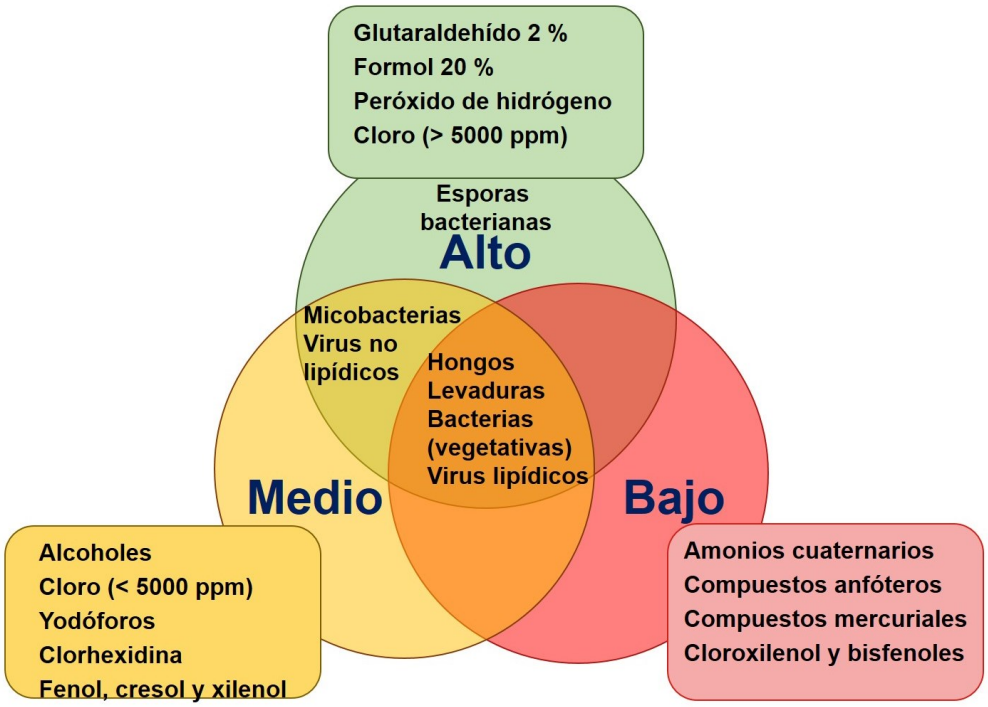


Figura 39. Clasificación de biocidas en función del nivel de acción. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3. Factores que afectan la actividad del biocida

3.1. Factores microbiológicos

3.1.1. Resistencia de los microorganismos

Los mecanismos de resistencia de los microorganismos tanto a los antimicrobianos de uso clínico como a los biocidas pueden ser innatos o adquiridos mediante cambios genéticos. Existe una amplia variación en la sensibilidad innata o propia de los microorganismos a los desinfectantes en general, como se observa en la figura 40. En el caso de la **resistencia innata** a biocidas se sabe que el principal mecanismo involucrado es la impermeabilidad celular. Como ejemplo, 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, además del ingreso de estos últimos, también a fenoles y clorhexidina. En este mismo sentido, el desarrollo microbiano en biopelículas genera mayor resistencia a los biocidas comparado con el crecimiento planctónico.

Particularmente, los priones son los más difíciles de inactivar, debido a su estructura requieren procesos de desinfección química muy específicos, ya que son resistentes a los desinfectantes de alto nivel como los aldehídos. Los tratamientos químicos recomendados

para eliminar priones son: hipoclorito de sodio al 2% (20.000 ppm), inmersión en solución de hidróxido de sodio 1N.

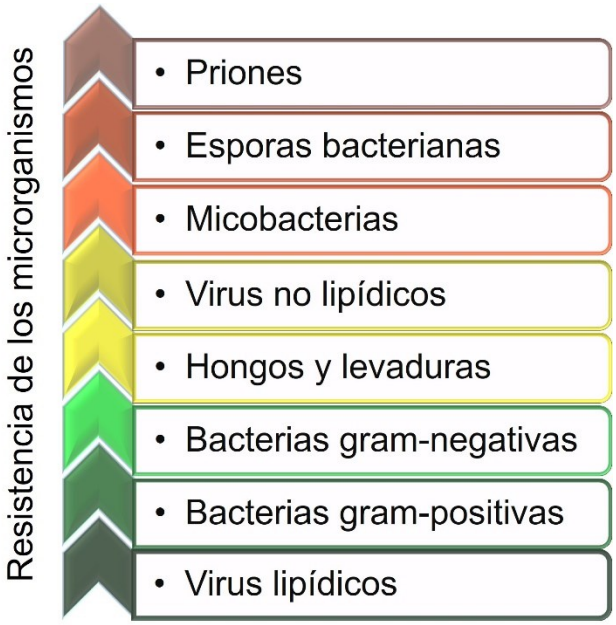


Figura 40. Resistencia innata de los microorganismos a los biocidas. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

Por otra parte, algunos microorganismos pueden mostrar **resistencias adquiridas**, principalmente por la incorporación de plásmidos, y que, además, suelen mostrar asociación con resistencias a antimicrobianos generando co-resistencia y resistencia cruzada. Por ejemplo, en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente al antibiótico meticilina, una disminución de la susceptibilidad a gluconato de clorhexidina (el antiséptico que probaremos en la parte práctica) está asociada con los genes *qac*A, *qac*B y *smr*, que codifican bombas de eflujo (proteínas de membrana que transportan compuestos desde el interior de las bacterias hacia el exterior), las cuales otorgan resistencia de bajo nivel tanto para el biocida como para algunos antibióticos. Esto es importante a la hora de evaluar la actividad de un biocida mediante pruebas de desafío, ya que deberemos probar un amplio rango de microorganismos con distinta sensibilidad.

3.1.2. Densidad microbiana

Está demostrado que, bajo las mismas condiciones de evaluación, una mayor densidad microbiana requiere mayor tiempo para que el biocida ejerza su acción. Esto se debe a que la mayoría de los biocidas necesitan una etapa previa de adsorción a la superficie celular antes de poder actuar. Como consecuencia, una reducción logarítmica de 3 log (99,9 %) partiendo de una carga de 10^8 o 10^4 células no requieren la misma cantidad de tiempo para ambos casos. La carga microbiana inicial debe estar perfectamente estandarizada en toda prueba de desafío de biocidas.

3.2. Factores físico-químicos

3.2.1. Concentración del biocida

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

$$\eta = \frac{\log t_2 - \log t_1}{\log C_1 - \log C_2} \qquad \text{(Ecuación 8.1)}$$

Donde C_1 y C_2 son concentraciones alta y baja del biocida, respectivamente, mientras que t_1 y t_2 son los tiempos requeridos para destruir una carga microbiana estándar a las correspondientes concentraciones. Biocidas con valores de η altos, necesitan mayor tiempo de exposición al ser diluidos, cuando ese valor supera 5 la dilución es crítica y pequeños cambios alteran considerablemente la eficacia (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de η para distintos biocidas

Biocida	**Valor de η**
Peróxido de hidrógeno	0,5
Hipoclorito de sodio	0,5
Compuestos mercúricos	0,03–3,0
Clorhexidina	2
Compuestos de amonio cuaternario	0,8–2,5
Parabenos	2,5
Alcoholes bencílicos	2,6–4,6
Alcoholes alifáticos	6,0–12,7
Fenol	6

3.2.2. Temperatura

La temperatura y la constante de inactivación (k) son siempre directamente proporcionales, y están relacionadas por el coeficiente Q10 según la siguiente fórmula:

$$Q10 = \frac{\text{tiempo de muerte a } T_0}{\text{tiempo de muerte a } (T_0 + 10\ ^\circ C)} \qquad \text{(Ecuación 8.2)}$$

Donde T_0 y (T_0 +10 °C) son temperaturas que difieren exactamente en 10 °C. Al aumentar la temperatura de exposición se favorece la eficacia del biocida permitiendo una reducción del tiempo de exposición, Debido a este tipo de variación, la estandarización de este parámetro en las pruebas de desafío de biocidas es de fundamental importancia.

3.2.3. Tiempo de contacto (cinética de inactivación)

La acción de un biocida requiere un tiempo mínimo de contacto para ser llevado a cabo satisfactoriamente, dado que dicho proceso **NO ES INSTANTÁNEO**.

La cinética de inactivación (o muerte) microbiana por acción de biocidas se aproxima a una reacción de orden 1, donde en cada punto la velocidad de acción del desinfectante o constante de inactivación puede calcularse según:

$$\ln N_t = \ln N_0 - kt \qquad \text{(Ecuación 8.3)}$$

Donde:

N_t= número de microorganismos sobrevivientes al tiempo seleccionado de contacto

N_0= número de microorganismos inicial

k = constante de inactivación (depende del microorganismo, del agente empleado y de su concentración)

t = Tiempo

Si graficamos ln N vs t se obtiene una recta de cuya pendiente se puede calcular la constante de inactivación para un determinado desinfectante.

3.2.4. Tipo de superficies

Para los desinfectantes es necesario considerar el material de la superficie para poder evaluar los siguientes aspectos:

1) *Contacto entre la superficie y el agente:* La solución del agente debe “mojar” completamente la superficie a tratar, en aquellas superficies muy hidrofóbicas deberán emplearse sustancias que reducen la tensión superficial, para que el agente se distribuya en forma homogénea.
2) *Adsorción del agente desinfectante*: Si existe adsorción sobre la superficie manteniendo su actividad biocida puede ejercer acción residual, sin embargo, si es demasiado fuerte la adsorción puede impedir el contacto con los microorganismos y en este caso la acción biocida se verá reducida.
3) *Efectos corrosivos del agente sobre la superficie:* esta es una gran limitación de muy buenos agentes desinfectantes como los oxidantes que pueden dañar superficies metálicas, favoreciendo el ingreso de microorganismos a dicha superficie.

4) *Presencia de humedad:* no sólo puede diluir el agente cambiando su concentración, sino que, además, las superficies que permanecen húmedas tienen más riesgo de contaminación.

3.2.5. Presencia de posibles interferentes

1) *pH:* el pH del medio interviene en el grado de disociación de la molécula de biocida. 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 material o superficie a tratar, al elegir un biocida.
2) *Dureza del medio:* los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) presentes en el agua utilizada en las diluciones pueden bloquear la adsorción del biocida sobre la célula y de esta manera interferir en la actividad del biocida.
3) *Materia orgánica*: 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 biocida, la protección física del microorganismo, o la formación de compuestos insolubles.

4. Evaluación de agentes biocidas

Las primeras evaluaciones de biocidas comenzaron en el siglo XIX con Robert Koch, quien sumergía hilos de seda previamente inoculados con *Bacillus anthracis* en compuestos desinfectantes. A inicios del siglo XX, Rideal-Walker introdujo el "coeficiente de fenol" para estandarizar la comparación de biocidas con fenol, el desinfectante de mayor difusión en la época. Sin embargo, con la aparición de nuevos biocidas, este método se volvió obsoleto. En la década de 1970, Kelsey y Sykes propusieron pruebas de desafío que simulaban condiciones reales de uso y además incluían un paso de neutralización para evitar errores por la acción residual. Actualmente, existen estándares internacionales para la evaluación de biocidas, como los establecidos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) en Estados Unidos o el Comité Europeo para la Normalización (CEN), en Europa.

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 biocida. Corresponden a las normas EN 1040 y EN 1275 para actividad antibacteriana y antifúngica, respectivamente.

Fase 2: Evalúa las condiciones representativas de uso en diferentes ámbitos (área médica, industria alimenticia, veterinaria) e incluye:

➔ Paso 1: Prueba de suspensión cuantitativa: se asemeja a las pruebas en fase 1 pero se utiliza albúmina bovina para simular la presencia de materia orgánica (Ver pruebas prácticas).

➔ Paso 2: Prueba de superficie cuantitativa. Se evalúa sobre superficies porosas y no porosas (Ver pruebas de portador)

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 fundamental respetar estrictamente todas las condiciones de prueba expresadas en la norma.

4.1. Tipos de pruebas de desafíos

4.1.1. Pruebas en suspensión (Fase 1 y Fase 2, paso 1)

Estas pruebas se basan fundamentalmente en enfrentar una suspensión bacteriana estándar con el biocida. Luego del tiempo de exposición se toma una alícuota y se somete a un proceso de neutralización del biocida remanente con agentes específicos. Finalmente, luego de un tiempo de contacto con el neutralizante, se evalúa el número de microorganismos sobrevivientes mediante el método de recuento en placa.

Es fundamental especificar y estandarizar el volumen y la concentración tanto del biocida como del neutralizante y el microorganismo. 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 biocida.

El tiempo y la temperatura de exposición dependen de la norma y del uso que se le vaya a dar al biocida. La temperatura debe ser constante y específica durante toda la reacción.

El proceso de neutralización debe ser validado y su implementación pretende evitar errores de medición provocados por la acción residual luego del tiempo de contacto. Es importante corroborar tanto su eficacia de neutralización hacia el biocida (debe frenar su acción) y su toxicidad frente al microorganismo (Ver figuras 8.6 y 8.7 en la apartado 8.5). Un neutralizante que inactive al microorganismo tendrá un efecto aditivo y no permitirá distinguir si el biocida es realmente eficaz.

En general, las distintas normas existentes proveen tablas con los neutralizantes a usar según la estructura química del biocida (Tabla 11).

Tabla 11. Ejemplos de neutralizantes para distintos biocidas.

Biocida	**Neutralizante**
Alcoholes en gel	Tween 80, saponina, histidina y lecitina
Ácido benzoico	Tween 80
Clorhexidina	Tween 80 y lecitina
Glutaraldehído	Glicina
Halógenos	Tiosulfato de sodio
Compuestos mercúricos	Ácido 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 (EB), también conocido como reducción logarítmica, se calcula según la siguiente fórmula:

$$BE = \log (N_C) - \log (N_D) \qquad \text{(Ecuación 8.3)}$$

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 o antiséptica requiere de un BE equivalente a 5 log (99,999 %). Es decir, si partimos de una población de 10^6 UFC/ml, luego del tratamiento no debemos detectar más de 10 UFC/ml. Mientras que, un BE o reducción de 3 logaritmos es el requisito necesario para una sanitización (Tabla 12).

Tabla 12. Relación entre BE y la reducción porcentual

Reducción logarítmica	**Microorganismos sobrevivientes (UFC)**	**Reducción porcentual (%)**
0 log	10^6	0
1 log	10^5	90
2 log	10^4	99
3 log	10^3	99,9
4 log	10^2	99,99
5 log	10^1	99,999
6 log	$10^0 = 1$	99,9999

Las pruebas en suspensión son ensayos perfectamente estandarizados, aunque su enfoque es poco práctico. Por ello, la CEN establece pruebas de suspensión en la fase 2, paso uno que intentan imitar las condiciones de uso real que tendrá el biocida. 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 para imitar condiciones de suciedad.

4.1.2. Pruebas de capacidad

El objetivo de esta prueba es medir la capacidad de conservar la actividad desinfectante en situaciones donde la contaminación aumenta gradualmente, por ejemplo, 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. En líneas generales, el ensayo se basa en realizar agregados sucesivos de una suspensión bacteriana estándar sobre un volumen y dilución predeterminados de desinfectante, a intervalos regulares. Antes de cada nuevo agregado, se realiza un repique de la mezcla para establecer el recuento de microorganismos viables.

Este tipo de pruebas permite definir la concentración de desinfectante óptima a utilizar en las condiciones de contaminación habituales de un establecimiento sanitario o industria. Además, permite determinar cuándo se ha agotado la capacidad desinfectante del agente microbicida.

4.1.3. Pruebas de portador (Fase 2, paso 2)

Son pruebas de superficie que utilizan un elemento (portador) que se contamina deliberadamente de acuerdo a un procedimiento estándar. El portador puede ser un trozo de tela de algodón, un cilindro o un disco de acero inoxidable o un portaobjeto de vidrio de dimensiones estándares, entre otros. Primero el portador se contamina con una suspensión microbiana estandarizada y se deja secar, luego se sumerge en la dilución del desinfectante durante un tiempo de exposición determinado y se neutraliza en condiciones igualmente establecidas. A continuación, se determinan los microorganismos remanentes por impresión en una placa de contacto tipo RODAC o mediante una técnica de enjuague, en la que el portador se enjuaga en un diluyente y se determina la concentración microbiana viable en el diluyente. Se utilizan al menos 10 portadores para cada combinación bacteria - dilución de desinfectante por motivos estadísticos, ya que el proceso de secado puede disminuir la viabilidad afectando así la reproducibilidad del método.

5. Pruebas prácticas

Son pruebas realizadas en el laboratorio, que imitan las condiciones de uso real que tendrá el biocida. En estos casos se utilizan como portadores los distintos tipos de materiales que

deberá enfrentar el desinfectante, como pueden ser materiales de instrumental biomédico (endoscopios) o baldosas cerámicas de un piso. La principal diferencia con las pruebas de portador es que el desinfectante se aplica y se deja secar durante el tiempo de exposición.

5.1.1. Pruebas de campo (Fase 3 según EN)

Se llevan a cabo en el lugar y circunstancia en la que realmente se utilizará el biocida que se quiere probar. Son pruebas que se diseñan específicamente para ese uso en particular y son muy difíciles de estandarizar. Su principal función es confirmar el resultado de otras pruebas previas. Como ejemplo podemos citar cuando queremos comprobar si la solución de un balde luego de la desinfección de pisos de un área del hospital permaneció activa hasta el final de su uso, para lo cual procederemos a neutralizar y cultivar muestras de dichos desinfectantes ya utilizados. Otro ejemplo sería la toma de muestra y cultivo de paredes y pisos de un quirófano, una vez desinfectado. Para este objetivo, suelen utilizarse placas RODAC (Replicate Organisms Direct Agar Contact), que son placas con medio agarizado de superficie convexa en vez de plana. Dichas placas se apoyan directamente sobre la superficie a estudiar y se llevan tapadas a la estufa de cultivo (Figura 41).

Figura 41. Placa RODAC. Nota. Imagen de dominio público.

Los medios de cultivo en estas placas contienen neutralizantes (polisorbato y lecitina) para prevenir falsos negativos producidos por el efecto residual del biocida. Para superficies irregulares, cóncavas, convexas o de difícil acceso, como las esquinas o zócalos, se utilizan hisopos estériles embebidos con agua destilada estéril o bien con una solución amortiguadora conteniendo los neutralizantes. Posteriormente, el hisopo se enjuaga en solución salina estéril para suspender los microorganismos y alícuotas de dicha solución se transfieren a placas de Petri con un medio de cultivo apropiado.

5.1.2. Pruebas para la actividad antifúngica y viricida

Las pruebas anteriores pueden adaptarse para medir actividad antifúngica modificando los medios de cultivo utilizados, los tiempos de exposición y las condiciones de incubación (tiempo y temperatura). La norma europea 1650 utiliza como organismos de referencia *C. albicans* (levadura) y *Aspergillus brasiliensis* (hongo filamentoso).

Entre los virus propuestos para estos ensayos se encuentran rotavirus, adenovirus, poliovirus, virus herpes, simplex, HIV, poxvirus, papovavirus, virus de la hepatitis B y C. El

mayor desafío de estos ensayos 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. La norma europea específica para esta evaluación es la EN 14476 - “Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad viricida en el área médica”. Los ensayos corresponden a la fase 2 etapa 1 dentro de la metodología del CEN. Esta norma requiere como obligatorio incluir tres tipos de virus: Poliovirus tipo 1, Adenovirus tipo 5 y Norovirus murino, debido a que son más resistentes a la acción de los biocidas.

5.1.3. Evaluación de desinfectantes aéreos

Para evaluar desinfectantes aéreos se deben aerosolizar 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 42), 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.

Figura 42. Técnica de muestreo de aire. Nota. Imágenes reproducidas desde folleto Bact Air. Reproducidas con permiso.

5.1.4. Ensayo de eficacia de conservantes

El apartado 80 de la Farmacopea Argentina 7ma edición, codifica este ensayo para productos farmacéuticos estériles y no estériles formulados en base acuosa. 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. Asimismo, 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. Los métodos de evaluación son adaptaciones de las pruebas de suspensión donde se usa el producto conservado a evaluar, en su envase final, en lugar de la suspensión de conservante estándar y se evalúa la eficacia por periodos de 7, 14 y 28 días, según el medicamento testeado.

BIBLIOGRAFÍA

Gilmore B. F., Denyer, S. P. (Eds.). (2023). *Hugo & Russell´s Pharmaceutical Microbiology* (9ª Ed). Oxford, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.

Fraise, A. P., Lambert, P. A. y Maillard, J. Y. (Eds.). (2008). *Principios y práctica de desinfección, conservación y esterilización de Russell, Hugo y Ayliffe* (4° Ed). Malden, Massachusetts, United States: Blackwell Science.

Horak, C., Zarankin, E., Torno, G., Cerra, H., Fernández, M. y Lagomarsino, M. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.

ACTIVIDADES DE DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Evaluar la capacidad antiséptica de un enjuague bucal de clorhexidina según la norma EN 1040.
2) Calcular la reducción logarítmica para obtener el efecto bactericida BE.

PARTE PRÁCTICA

1. Prueba de suspensión cuantitativa de acuerdo a la norma EN 1040

➔ *Microorganismo de referencia: Staphylococcus aureus* ATCC 6538

➔ *Materiales requeridos*

- Tubos Eppendorf estériles
- Pipetas automáticas P200 y pipetas de 1 ml
- Tips estériles

- Espátulas de Drigalski
- Escala 0,5 de McFarland
- Vórtex
- 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*

1) Realizar una suspensión del microorganismo de referencia de turbidez equivalente a 0,5 McFarland (dicha escala se prepara agregando 0,5 ml de $BaCl_2$ 0,048 M (1,75 % p/v $BaCl_2$.H2O) a 99,5 ml de H_2SO4 0,18 M (0,36 N) (1 % v/v). Esta debe ser utilizada dentro de los 15 minutos de preparada.
2) *Preparación de los tubos prueba - Figura 43*.
   a) Enfrentar 800 µl de antiséptico, 100 µl de agua destilada estéril y 100 µl de suspensión bacteriana. Agitar bien en vórtex e incubar los tubos en un baño termostático a 35 °C, para imitar las condiciones reales de la cavidad oral.
   b) Luego de 5 min ± 5 segundos de exposición (tiempo que se estima puede actuar un solución antiséptico bucal sin ser enjuagado luego de la aplicación hasta la desaparición completa causada por las secreciones salivales), retirar los tubos del baño, agitar en vórtex y transferir 100 µl de su contenido a un segundo tubo con 800 µl de solución neutralizante y 100 µl de agua destilada estéril.
   c) Luego de una nueva incubación de 5 min a 35 °C, agitar en vórtex y transferir 100 µl de su contenido a un tercer tubo con 900 µl de solución fisiológica estéril. Tanto del tubo 2 como del 3, previa agitación en vórtex, 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.

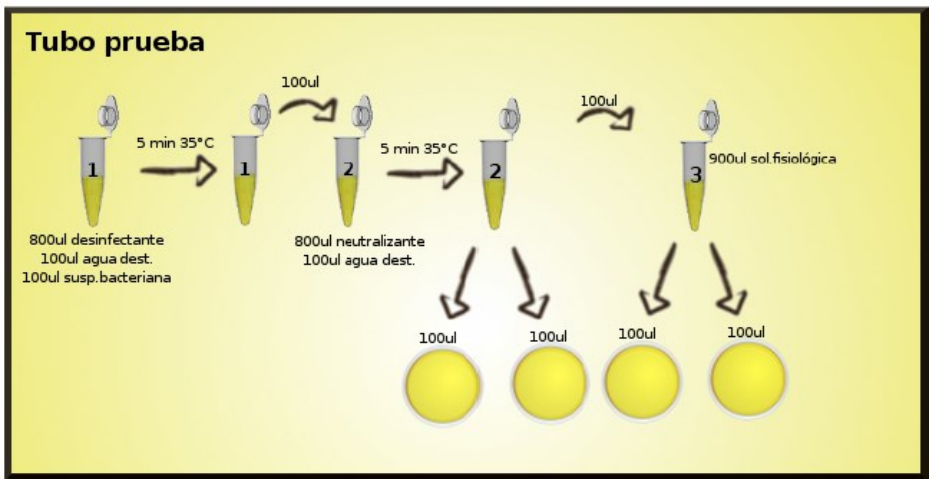


Figura 43. Tubo prueba de eficacia. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3) *Control del recuento bacteriano inicial- Figura 44*

a) Realizar seis diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril de la suspensión bacteriana, como muestra la figura correspondiente.

b) Inocular 100 µl de los tubos 5 y 6 en placas con agar para realizar un recuento por duplicado.

c) Distribuir con espátula de Drigalski e incubar 24 horas a 35 °C.

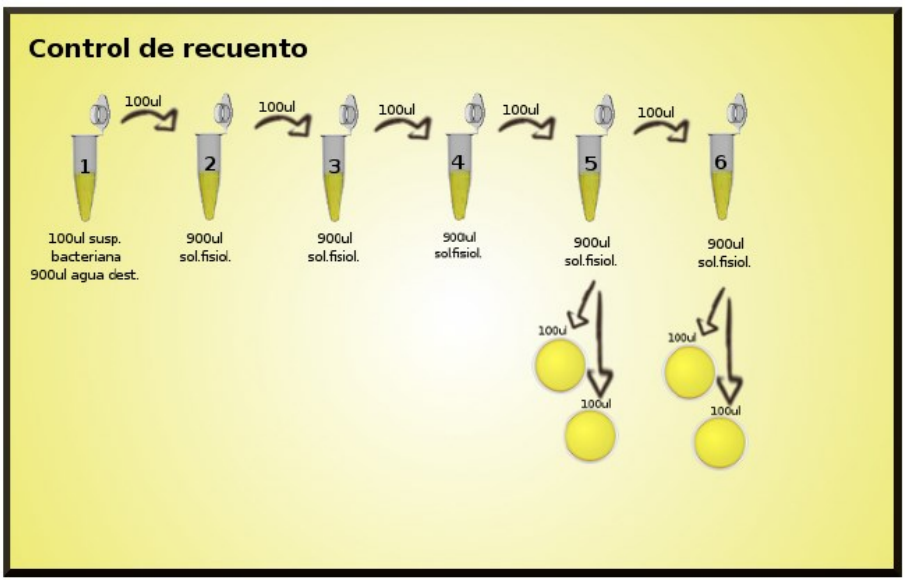


Figura 44. Control de recuento. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

4) Control de toxicidad del neutralizante- Figura 45

a) Realizar una dilución de la suspensión bacteriana con agua destilada estéril, equivalente a la que se produce en el tubo de prueba.

b) Inmediatamente después, agitar en vórtex 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.
c) Al finalizar la incubación realizar cuatro diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril.
d) Inocular 100 µl de los tubos 5 y 6 en placas con agar para realizar un recuento por duplicado.
e) Distribuir con espátula de Drigalski e incubar 48 h a 35 °C.

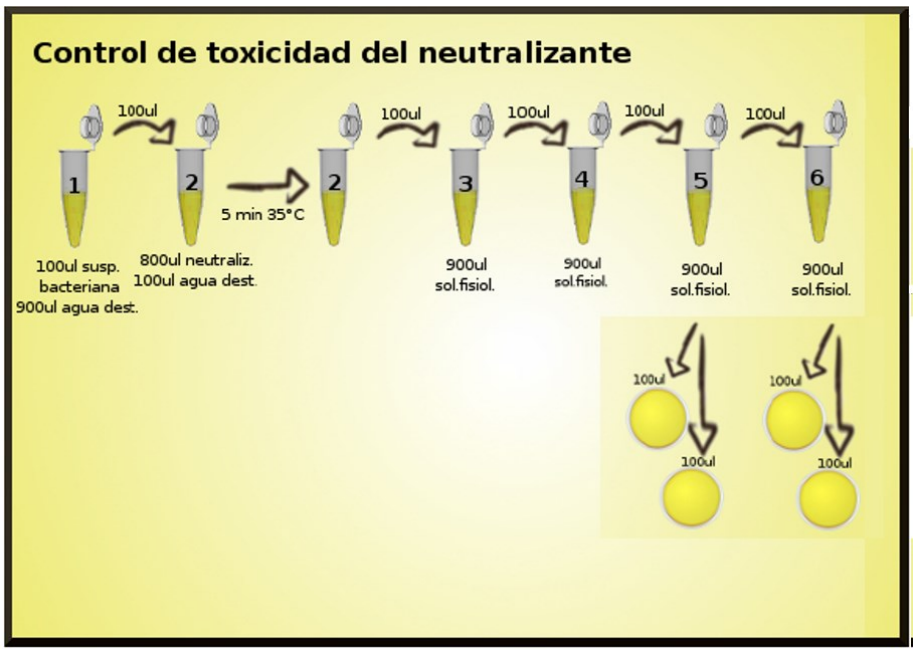


Figura 45. Control de toxicidad del neutralizante. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

5) Control de eficacia del neutralizante- Figura 46

a) Enfrentar 800 µl de antiséptico con 200 µl de agua destilada estéril, agitar y someter a la misma incubación que el tubo de 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.
b) 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.

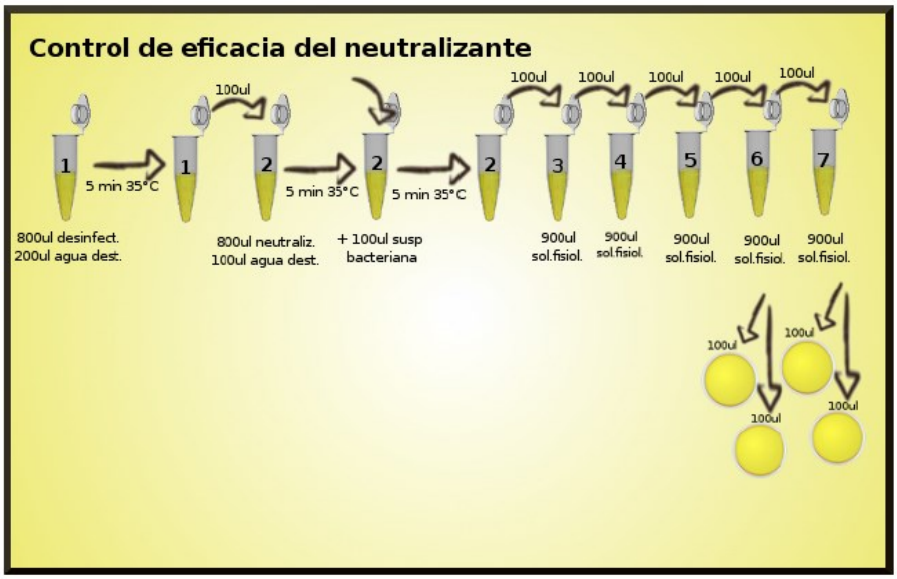


Figura 46. Control de eficacia de la neutralización. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2. Cuantificación del desarrollo y ejecución de los cálculos

➔ *Procedimiento*

1) 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 del neutralizante coincidan con el del control de recuento de la suspensión bacteriana.
2) Calcular el BE utilizando los recuentos del tubo prueba y del control de recuento de la suspensión bacteriana, mediante la ecuación 8.3.
3) Concluir si los enjuagues probados cumplen con el requisito de disminución mínima de la carga microbiana equivalente a 5 log.

10 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos

OBJETIVOS

1) Comprender los mecanismos de acción de los diferentes tipos de antimicrobianos y su clasificación.
2) Familiarizarse con las diferentes pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.
3) Interpretar los resultados de cada prueba y entender los factores que influyen en dicha interpretación.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Tipos de antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias producidas por microorganismos (ej.: penicilina) o por síntesis química (ej.: quinolonas), que en bajas concentraciones inhibe el crecimiento de otros microorganismos. El término “antibiótico” se acuñó para diferenciar los compuestos de origen microbiano de los antimicrobianos sintéticos. Actualmente, en la práctica clínica este término pasó a ser sinónimo de antibacteriano, es decir, sustancia antimicrobiana que actúa sobre las bacterias. Teniendo en cuenta el microorganismo diana los antimicrobianos, podrán dividirse, de acuerdo al microorganismo sobre el que actúan, en:

- antibacterianos o antibióticos,
- antifúngicos: actúan sobre hongos
- antivirales: inhiben la replicación de los virus
- antiparasitarios: actúan sobre los parásitos

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 antimicrobiano en la terapia de una infección depende de diversos factores:

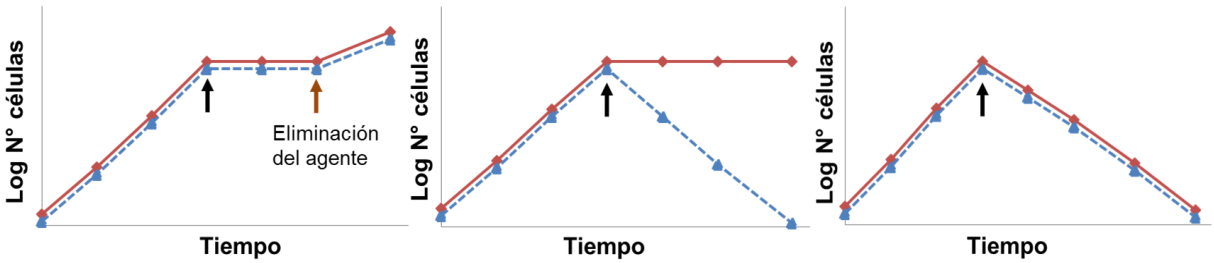
- Tipo de microorganismo (obtenido por cultivo o sospechado por el contexto epidemiológico).
- Sensibilidad del agente patógeno (obtenida por antibiograma o supuesta según epidemiología).
- Gravedad y localización de la infección.
- Toxicidad (efectos adversos) del agente antimicrobiano.
- Antecedentes de hipersensibilidad en el paciente y otros factores del hospedador.
- Costo

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

2. Tipos de efectos antimicrobianos

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

1) *Bacteriostático y 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. Debido a que la unión con la diana es débil y reversible, al eliminar el agente se reanuda el crecimiento (Figura 47a). Ejemplos: son los inhibidores de los ribosomas (excepto aminoglucósidos), sulfonamidas y griseofulvina (antifúngico)
2) *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 47b). Los agentes bactericidas son agentes químicos que se unen fuertemente a sus dianas celulares y no se eliminan por dilución como por ejemplo los aminoglucósidos, quinolonas, rifamicinas, polienos antifúngicos (dependiendo de la concentración).
3) *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 disminuye (Figura 47c). En este grupo se encuentran los inhibidores de la síntesis de la pared celular (betalactámicos).



(a) Bacteriostático **(b)** Bactericida **(c)** Bacteriolítico

Figura 47. Tipos de actividad antimicrobiana. Se añadió el agente antimicrobiano en una concentración inhibidora, a un cultivo en fase exponencial de crecimiento, en el tiempo indicado por la flecha negra. Trazo continuo (rosa): células totales determinadas por DO, Trazo punteado (celeste): células viables determinadas por recuento en placa. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

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 antimicrobianos interfieren en:

1) Inhibición de la síntesis de la pared celular. Ejemplos:
   a) Antibióticos: betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos), cicloserina, fosfomicina, glucopéptidos (vancomicina).
   b) Antifúngicos: equinocandinas (caspofungina, micafungina).
2) Alteración de la permeabilidad o de la síntesis de la membrana celular. Ejemplos:
   a) Antibióticos: lipopéptidos (polimixina B, colistina, daptomicina)
   b) Antifúngicos: azoles (miconazol, fluconazol), alilaminas (terbinafina), polienos (anfotericina B, nistatina).
3) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. Ejemplos: quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina) y nitroimidazoles (metronidazol) que inhiben la síntesis de ADN. Rifamicinas que inhiben la síntesis de ARN.
4) Inhibición de la síntesis proteica bacteriana (ribosomas). Ejemplos: aminoglucósidos (estreptomicina, gentamicina, neomicina), fenicoles (cloranfenicol, tianfenicol), tetraciclinas (clortetraciclina, doxiciclina, minociclina), macrólidos (eritromicina, azitromicina) y lincosamidas (lincomicina, clindamicina).
5) Bloqueo de la síntesis de ciertos metabolitos esenciales para la célula bacteriana (ác. fólico). Ejemplos: sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfadiazina) y trimetoprima.

Es importante destacar que, además de la estructura química y el mecanismo de acción, la concentración alcanzada en la diana, el tiempo de acción, el tipo de microorganismos, y el tamaño de inóculo, también influyen en el tipo de efecto antimicrobiano alcanzado por un antibiótico particular.

4. Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad son ensayos que determinan cuán susceptible o resistente es un microorganismo a uno o más antimicrobianos. Los procedimientos han sido normalizados y están estandarizados internacionalmente por normas como las del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo sobre pruebas de sensibilidad antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés). Además, proveen tablas de interpretación de resultados con actualizaciones anuales. En Argentina y Latinoamérica, se siguen principalmente las pautas del CLSI.

4.1. Pruebas de dilución

Estas técnicas de referencia determinan cuantitativamente la actividad inhibitoria "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo microbiano. Se preparan tubos con caldo o placas

con agar, a los que se les agrega el antimicrobiano en concentraciones crecientes, y se inoculan con una suspensión estándar del microorganismo.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM): menor concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación del microorganismo. Se expresa en µg/ml.

El valor de la CIM orienta sobre la concentración necesaria del antimicrobiano en el sitio de infección para inhibir el microorganismo y se ve representada por el tubo o placa con menor concentración que evidencia ausencia de turbidez o desarrollo microbiano.

El antimicrobiano puro se obtiene de laboratorios productores o comercialmente (debe contener número de lote, potencia en µg o UI/mg y fecha de vencimiento), debe almacenarse y prepararse según las recomendaciones para mantener su eficacia (generalmente a -20 °C).

4.1.1. Prueba de dilución en caldo

➔ *Procedimiento*

A partir de la solución madre del antimicrobiano, se realizan diluciones seriadas al medio en tubos de hemólisis estériles con caldo Mueller Hinton para ensayar compuestos antibacterianos, o caldo RPMI para ensayar agentes antifúngicos. Luego, se realiza una suspensión del microorganismo a estudiar, de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland y se realiza una dilución 1/100 de esta suspensión en el caldo de cultivo. Con esta dilución se inoculan los tubos con antimicrobiano.

Además, se prepara un tubo con medio de cultivo sin inocular que sirve como control de esterilidad y otro tubo con medio e inóculo, pero sin antimicrobiano, que es el control de desarrollo (o control de crecimiento). Se incuba de 18-24 h a 35 ± 2 °C.

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

➔ *Lectura e interpretación de los resultados*

Se observa el desarrollo bacteriano, evidenciado por la turbidez de los tubos. El microorganismo crece en el tubo control de crecimiento y en todos los otros que no contengan suficiente antimicrobiano para inhibir el desarrollo.

4.1.2. 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. La siembra se realiza en forma de gota, utilizando un dispositivo llamado “replicador de Steers” (Figura 48). Las distintas cepas en estudio se colocan en pocillos del soporte reservorio, al descender el cabezal las puntas recogen un volumen definido que luego es depositado sobre una placa de Petri con medio de cultivo

agarizado. Dependiendo del volumen que inocule el replicador, la suspensión bacteriana equivalente al tubo 0,5 de McFarland, deberá o no, diluirse en 1/10.

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

(a) Figura tomada con permiso de http://www.steers-replicator.com

(b) Enlace a video

(c) Enlace a foto de CIM por dilusión en placa, luego de la incubación

Figura 48. a) Replicador de Steers, **b)** Inoculación de Placas, **c)** Placa luego de la incubación.

4.2. Pruebas de difusión

4.2.1. 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 cualitativo que le asigna al aislamiento microbiano alguna de las categorías descritas más adelante.

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 del antimicrobiano. Alrededor del reservorio se formará eventualmente una zona de inhibición del crecimiento (Figura 49).

Figura 49. Halos de inhibición de monodiscos en placa de Petri. Nota. Imagen tomada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

➔ *Factores que influyen en el diámetro del halo de inhibición*

Los factores fundamentales son:

1) *Sensibilidad* del microorganismo al antimicrobiano.
2) *Carga de antimicrobiano en el disco*: se deben usar discos con el diámetro y la concentración de antimicrobiano con que fue estandarizada la técnica que se encuentren dentro de su período de vigencia y se almacenan refrigerados y protegidos de exceso de humedad. Los discos de penicilinas y cefalosporinas se deben almacenar a -20 °C para conservar su potencia.
3) *Espesor de la capa de agar*: se vierte el agar fundido en placas estériles en cantidad suficiente para obtener una altura de 4 ± 0,2 mm y evitar halos, excesivamente reducidos o ampliados.
4) *pH y composición del agar*: el agar Mueller-Hinton es considerado el mejor debido a que muestra buena reproducibilidad lote a lote, contiene bajo nivel de inhibidores para determinados antimicrobianos y permite un desarrollo adecuado de 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, preparadas y empaquetadas herméticamente, se pueden conservar entre 4 y 8 °C de 4 a 7 días.
5) *Capacidad de difusión de la droga en ese medio:* la difusión del antimicrobiano dependerá de su tamaño molecular, polaridad y solubilidad.
6) *Temperatura de incubación*: generalmente la temperatura es 35 ± 2 °C y es importante ya que influye tanto en la velocidad de difusión del antimicrobiano como en la velocidad de duplicación del microorganismo.
7) *Velocidad de duplicación bacteriana*.
8) *Tamaño y fase de crecimiento del inóculo*: El inóculo se debe preparar a partir de un cultivo en fase exponencial (de 18 a 24 horas 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 McFarland. 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 (por ejemplo, *S. aureus,* enterobacterias *y P. aeruginosa*), y ha sido modificado para probar microorganismos nutricionalmente exigentes (ej.: *Haemophilus, N. gonorrhoeae*).

4.2.2. Método epsilométrico

Es un método simple y cuantitativo para determinar la CIM usando una tira de nylon comercial con un gradiente de concentraciones de antimicrobiano. Al colocarla sobre una placa de agar inoculada con el microorganismo en estudio, se forma un área de inhibición elíptica tras la incubación que permite leer el valor de la CIM directamente en la tira (Figura 50). Este es el método de elección para estudiar la susceptibilidad de microorganismos problemáticos o con necesidades especiales (exigentes), como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, y anaerobios.

Figura 50. Determinación de la CIM por el método epsilométrico. Nota: Imagen tomada por Mg. Verónica I. Gómez, bajo licencia CC-BY-SA.

4.3. Informe de resultados

Según el valor de la CIM (dilución) o del diámetro de halo del antibiograma (difusión), 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, por lo tanto, el tratamiento terapéutico clínico será efectivo.

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 como en el caso anterior, 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 menores 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 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, en consecuencia, 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 valores que separan una categoría de otra se denominan puntos de corte clínicos y se basan en la información acumulada internacionalmente respecto de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los antimicrobianos, ensayos clínicos con los distintos tratamientos y posologías, así como también las 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 que recopilan los puntos de corte para cada combinación antimicrobiano-especie bacteriana se actualizan anualmente y tienen el siguiente formato tipo (Tabla 13).

Tabla 13. 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	

4.4. 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 (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 límpidos) 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. En el caso de agentes antifúngicos el término se conoce como Concentración Fungicida Mínima (CFM).

4.5. Curvas de muerte

Se enfrentan una solución de antimicrobiano y un inóculo microbiano estándar en un volumen fijo de caldo. 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 se demuestra la presencia o ausencia de actividad bactericida, su magnitud y su cinética.

4.6. 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.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación Argentina de Microbiología. (2008). *Antimicrobianos. Curso de Microbiología Clínica, Módulo 4* (2ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: AAM.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.* Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

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.

PARTE PRÁCTICA

1. Antibiograma

- ➔ *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:* tomar 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 McFarland.
- ➔ *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. Realizar estrías muy juntas en una dirección sobre toda la superficie del agar y repetir en 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.
- ➔ *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 (Figura 49). Antes de que transcurran 15 min de inoculadas, incubar las placas invertidas, en grupos no superiores a 5 placas, a 35 ± 2 °C durante 16 a 18 h. Seleccionar los discos según la bacteria:

  Enterobacterias: ampicilina (AM), ampicilina-sulbactam (AMS), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), piperacilina-tazobactam (PTZ), cefalotina (CEF), cefoxitina (FOX), gentamicina (GEN), levofloxacina (LEV), ciprofloxacina (CIP), trimetoprima-sulfametoxazol (T.M.S o SXT), amikacina (AKN), cefotaxima (CTX), cefuroxima (CXM), imipenem (IMP), meropenem (MER), aztreonam (AZT), ceftazidima (CAZ), nitrofurantoína (NIT), fosfomicina (FOS).

  Pseudomonas: piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), imipenem (IMP), meropenem (MER), amikacina (AKN), aztreonam (AZT).

  Staphylococcus: eritromicina (ERY), clindamicina (CLI), minociclina (MIN),

trimetoprima-sulfametoxazol (T.M.S o SXT), vancomicina (VAN), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), cefoxitina (FOX), amikacina (AKN), oxacilina (OXA), rifampicina (RIF), nitrofurantoína (NIT).

➔ *Lectura de los resultados e interpretación:* Luego de la incubación, medir el diámetro de los halos de inhibición incluyendo el disco utilizando un calibre digital o una regla y comparar con la tabla correspondiente de la CLSI.

2. Dilución en caldo por macrométodo

➔ *Preparación de la solución del antimicrobiano:* pesar 10 mg del antimicrobiano ampicilina y llevar a volumen en matraz aforado de 10 ml con agua destilada estéril (solución stock de 1000 µg/ml). En el momento de usar se diluye 1/10 con agua destilada estéril (solución de trabajo de 100 µg/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 McFarland. Diluir esta suspensión 1/100 colocando 100 µl en 9,9 ml de caldo Mueller-Hinton que será usada como inóculo.

➔ *Preparación de las diluciones del antimicrobiano:* rotular tubos de hemólisis estériles con los números del 1 al 10. Adicionalmente, rotular otro tubo como “control crecimiento” y uno más como “control esterilidad”. Con una pipeta de vidrio de 1 ml tomar 0,5 ml de la solución de trabajo del antimicrobiano (100 µg/ml), y agregar a los tubos ya rotulados 1 y 2 (50 y 25 µg/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 µg/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; µg/ml) y descartar 0,5 ml de la última dilución (Tabla 14).

➔ *Tomar una gradilla con 12 tubos de hemólisis estériles rotulados adecuadamente.* Colocar 0,5 ml de caldo Mueller-Hinton (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:* inocular cada uno de los tubos que contienen las diluciones con 0,5 ml de la suspensión microbiana excepto el control negativo. El volumen final será de 1 ml. Incubar 24 horas a 37 °C.

➔ *Lectura e interpretación de resultados:* al finalizar la incubación, agitar los tubos en vórtex 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.

Tabla 14. Prueba de dilución en caldo para determinación de la CIM.

Rótulo tubo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**control crecimiento**	**control esterilidad**
Paso 1 Caldo MH		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 Ampicilina (100ug/ml)	0,5ml	0,5ml										
Paso 3 Diluciones seriadas			↘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	
Dilución antimicrobiano (g/ml)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195	0,09		

11 Detección de mecanismos de resistencia antimicrobiana

OBJETIVOS

1) Reconocer los distintos mecanismos de resistencia de las bacterias.
2) Detectar dichos mecanismos mediante distintos métodos fenotípicos y genotípicos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1. Factores que contribuyen a la aparición de resistencia a antimicrobianos

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 habían convertido en resistentes. Incrementos similares se encontraron en los estreptococos, enterobacterias y otras. 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. 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:

1) La presión selectiva ejercida por el uso terapéutico de antibióticos en humanos, veterinaria y ganadería, tanto por prescripción formal como por libre empleo de los mismos. Se conoce como presión selectiva al fenómeno que ocurre cuando un subconjunto de una población bacteriana posee la capacidad de resistir la acción de un antibiótico, lo cual producirá la supervivencia de dicho subconjunto tras el desafío antibiótico, que luego podrá transmitir la resistencia a su progenie.
2) La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
3) El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
4) El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los microorganismos presentes de cada institución o comunidad.
5) La falta de cumplimiento del tratamiento.

2. Resistencia intrínseca y adquirida

La resistencia a los antibióticos se clasifica en dos tipos generales de acuerdo a su origen: intrínseca y adquirida.

2.1. Resistencia intrínseca

Esto sugiere que las propiedades inherentes de la bacteria (genes propios de la especie) son responsables de la prevención de la acción antibiótica. Este tipo de resistencia también se denomina innata o natural y siempre está **mediada por mutaciones que ocurren a nivel cromosómico**. Hay muchos antibióticos activos contra las bacterias gram positivas que no tienen ningún efecto sobre las bacterias gram negativas y viceversa (Tabla 15). 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. También las bombas de eflujo y las enzimas inactivadoras de antimicrobianos pueden ser de origen innato.

Tabla 15. Espectro de actividad de algunos antibióticos

Antimicrobiano	**Bacterias gram positivas**	**Bacterias gram negativas**
Penicilina G o V	estreptococos, estafilococos, clostridios, *Listeria* spp.	-
Ácido fusídico	*S. aureus*	-
Eritromicina	estreptococos, estafilococos, corinebacterias	*Legionella*, *Campylobacter*
Vancomicina	estreptococos, estafilococos, clostridios	-
Aminoglucósidos	*S. aureus*	Coliformes, *Pseudomonas*
Ácido nalidíxico	-	Coliformes
Colistina	-	Coliformes, *Pseudomonas*
Metronidazol	Anaerobios y microaerófilos	Anaerobios y microaerófilos

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

1) **Transiciones:** implican la sustitución de una purina por otra (A o G) o una pirimidina por otra (C o T).
2) **Transversiones:** implican un cambio de una pirimidina por una purina o viceversa.

3) **Mutaciones de desplazamiento del marco:** se producen cuando una o dos bases se insertan en la secuencia de ADN generando un cambio del marco de lectura que da como resultado un producto alterado.
4) **Macrolesiones:** alteraciones más grandes en la secuencia de ADN.
5) **Deleciones:** es la pérdida de parte de la secuencia de ADN.
6) **Inserciones:** añadir pares de bases adicionales a un gen.
7) **Duplicaciones:** se producen cuando se repite un segmento del ADN.

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 adquirida también puede producirse por mutaciones en el cromosoma, como se menciona en el apartado anterior, o bien ocurre por la adquisición de nuevos genes que codifican para la resistencia mediante transferencia horizontal de los mismos.

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 el riesgo de propagación o transferencia horizontal de la resistencia a los antibióticos, constituyendo así una amenaza epidemiológica.

3. Elementos involucrados en la transferencia horizontal de la resistencia[1]

Existen 3 elementos genéticos que son responsables de la transferencia horizontal de la resistencia a antimicrobianos: los plásmidos, los transposones y los integrones.

3.1. Plásmidos

El cromosoma bacteriano contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y la replicación de las células. Muchas bacterias también poseen elementos circulares extracromosómicos de ADN, conocidos como plásmidos, que son capaces de replicarse y transferirse independientemente del cromosoma. Estos elementos genéticos son conocidos como plásmidos y pueden codificar para un número de propiedades que incluyen resistencia a los antibióticos.

Los plásmidos tienen la capacidad de ser transferidos entre individuos de una misma 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.

[1] Repasar Genética bacteriana (tema 5 de teoría).

Existen tres mecanismos por los cuales se puede transferir un plásmido:

1) **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 codifican la información necesaria para su propia transferencia se denominan plásmidos conjugativos. Existen otras plásmidos denominados movilizables que no poseen esta propiedad, pero pueden ser transferidos si conviven con un plásmido conjugativo. Tanto las bacterias gram negativas como las grampositivas tienen la capacidad de conjugar (Figura 51 imagen izquierda).
2) **Transducción:** es un proceso por el cual el ADN se transfiere a través de 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 (Figura 51 imagen central).
3) **Transformación:** Es la capacidad de los ciertos microorganismos para la adquisición de ADN desnudo (libre) desde el medio ambiente. Esto se limita a ciertas bacterias, en particular *N. gonorrhoeae*, que es naturalmente competente para adquirir ADN de esta manera. Las 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 transformación también está limitada a los mismos organismos de una especie (Figura 51 imagen derecha).

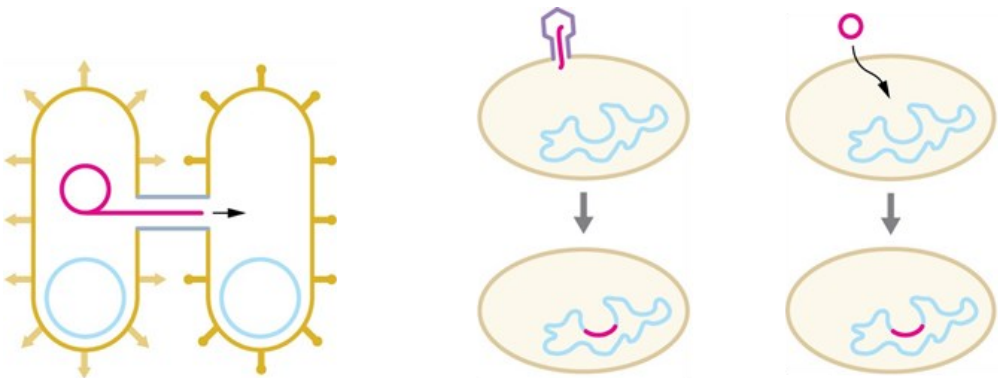


Figura 51. Mecanismos de transferencia genética horizontal en procariotas: conjugación (izquierda), transducción (centro) y transformación (derecha). Nota: Imágenes reproducidas desde Openstax books Microbiology. Licencia CC-BY 4.0.

3.2. Transposones

Son elementos genéticos móviles capaces de transferir independientemente una secuencia de ADN a otra. Los transposones normalmente contienen a cada lado secuencia de ADN idéntica conocidas como repeticiones (secuencias repetidas invertidas). Estas repeticiones funcionan como secuencias de reconocimiento para las enzimas implicadas en

la transposición denominada transposasas. Dichas enzimas pueden estar codificadas dentro del elemento transponible (transposón autónomo) o fuera de él (no autónomo) y catalizan el movimiento 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 movilizarse desde una molécula de ADN a otra ha llevado a que se conocen como genes saltarines (Figura 52).

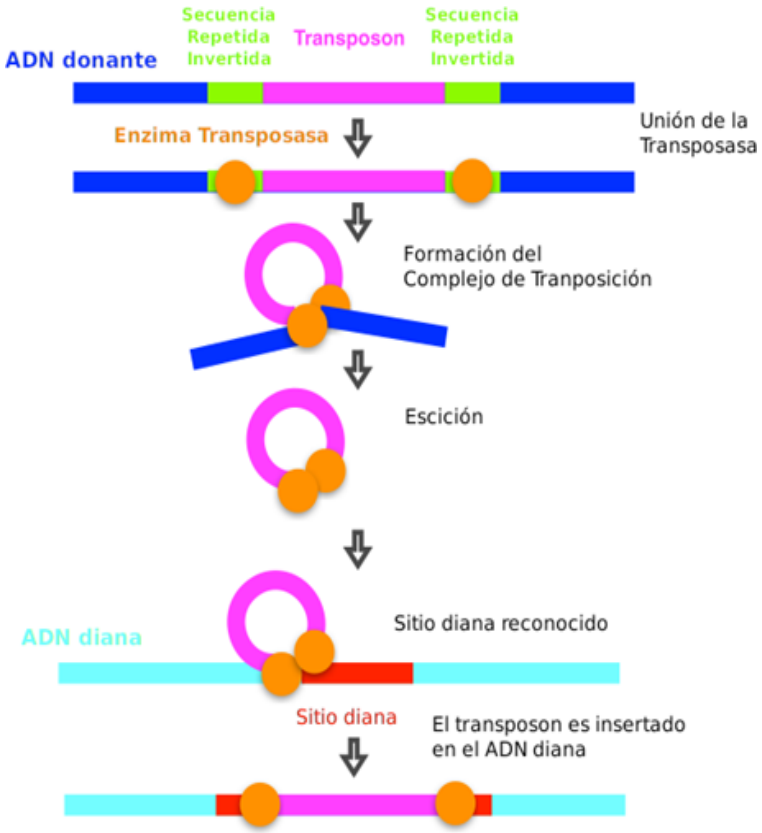


Figura 52. Mecanismo de transposición. Nota. Imagen de Alana Gyemi. Licencia CC-BY-SA 4.0. Wikimedia Commons. Traducida al español por Mg. Verónica I. Gómez. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cut_and_Paste_mechanism_of_transposition.svg

3.3. 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 *intI* que codifica una enzima integrasa que cataliza la recombinación entre las secuencias específicas.
2) un sitio adyacente de recombinación (*attI*),
3) al menos un promotor (Pc, P2), orientado para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor (Pint) y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados (Figura 53).

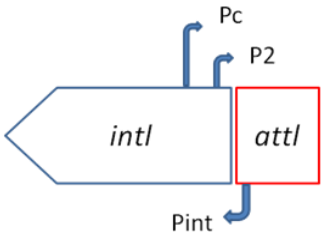


Figura 53. Estructura básica de un integrón. **Nota:** Imagen reproducida desde Di Conza, J. A., y Gutkind, G. O. (2010).

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.

4. Mecanismos de resistencia

Existen cinco mecanismos por los cuales se genera resistencia a los antimicrobianos. Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo:

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) que son sustratos de la enzima.

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.

El principal exponente de este mecanismo lo constituyen las betalactamasas, un grupo de enzimas producidas por gran diversidad de especies de grampositivos, gramnegativos y anaerobios, y que tienen la capacidad de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico. Este grupo incluye una amplia variedad de enzimas con distintas estructuras y perfiles de afinidad por sustratos. Por ejemplo, las penicilinasas poseen afinidad por las penicilinas únicamente, mientras que las cefalosporinasas tienen mayor afinidad por cefalosporinas que por penicilinas. Por su parte, las betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) son 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, incluyendo carbapenemes.

Estas enzimas pueden ser codificadas por genes en los cromosomas o en plásmidos. En términos generales, las betalactamasas de las bacterias grampositivas 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, formando una unión covalente que las neutraliza. Por ello, 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:

1) El perfil de sustratos de las enzimas
2) La susceptibilidad a inhibidores
3) Localización cromosómica o plasmídica de los genes
4) Las propiedades fisicoquímicas.

Otros ejemplos de modificaciones enzimáticas de antimicrobianos son:

- ➢ Cloranfenicol acetiltransferasa (Cat) codificada por el gen *cat* que inactiva cloranfenicol en gram-positivas y gram-negativas.
- ➢ Eritromicinas esterasas (Ere) codificadas por distintos genes *ere* que hidrolizan el anillo lactona de la eritromicina.
- ➢ Fosfatasas (APHs), acetiltransferasas (AACs) y nucleotidil transferasas (ANTs) que fosforilan, acetilan y adenilan, respectivamente a los aminoglucósidos.

4.2. Exclusión

4.2.1. Exclusión por impermeabilidad

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 gramnegativas, se conoce una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de la membrana externa llamadas porinas. Estas porinas varían en número y 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 impiden 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 genes que codifican las porinas, que provocan cambios en su estructura o una reducción del número,

restringiendo 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 por impermeabilidad de la membrana externa. La impermeabilidad por sí sola genera resistencia de bajo nivel, ya que al mismo tiempo impediría la entrada de otras moléculas esenciales, volviéndola incompatible con la vida. Sin embargo, cuando está acompañada por otros mecanismos diferentes sí se puede obtener altos niveles de resistencia.

4.2.2. Exclusión por bombas de eflujo

Consiste en proteínas transmembrana dependiente de energía (porque actúa en contra de un gradiente de concentración) que expulsa el antibiótico una vez que ha entrado a la bacteria. Los altos niveles de resistencia se deben a la sobreproducción intrínseca de estas bombas o a la adquisición extrínseca de genes que las codifican. Ejemplos, en bacterias gram-positivas existen bombas de expulsión de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas codificadas por genes *mef* (macrólidos)*, mrs* (macrólidos y estreptograminas) y *vga* (lincosamidas y estreptograminas). En tanto que, las bombas de eflujo multidroga de la superfamilia Resistencia a División por Nodulación (RND) son exclusivas de bacterias gram-negativas y ejemplos son AcrAB-TolC en *E. coli* y el sistema MexAB-OprM en *P. aeruginosa*. Estas bombas son transportadores de membrana activos que utilizan la fuerza protón-motriz como fuente de energía y que además son capaces de expulsar desinfectantes y antisépticos.

4.3. Alteración de sitios blanco

Los cambios en los sitios blancos del antibiótico evitan el efecto del antimicrobiano y se traduce en una pérdida de la afinidad imposibilitando la destrucción del microorganismo Estas modificaciones constituyen uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos de uso clínico pudiendo ocurrir en dos niveles:

a) **Intracelular:** los cambios estructurales en el ribosoma de bacterias gram positivas implican la metilación adenina en el dominio V del ARNr 23S. Dicha metilación ocurre por acción de una enzima metilasa codificada por el gen *erm.* Este tipo de mecanismo otorga resistencia a tres familias de antibióticos (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas=MLS) y puede ser detectado fenotípicamente como se explicará más adelante.
b) **Extracelular:** tanto bacterias gram-positivas (*S. aureus, S. pneumoniae*) como gram-negativas (*E. coli, H. influenzae*) son capaces de modificar las PBP que se encuentra en

la pared celular y son el sitio activo de antibióticos betalactámicos. El ejemplo más significativo ocurre en *S. aureus* meticilino resistentes (SARM) que poseen el gen cromosómico *mecA* que codifica una PBP2a con baja afinidad por meticilina y el resto de los betalactámicos. Otro ejemplo de alteración extracelular ocurre en los enterococos con resistencia VanA. Estas bacterias poseen el elemento transponible *Tn1546* que contiene siete genes. El gen *vanA* le confiere altos niveles de resistencia a los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina. El gen codifica una proteína que actúa como D-alanina-D-lactato ligasa, sustituyendo en el peptidoglicano a la D-alanina-D-alanina por D-alanina-D-lactato que se une de manera inestable con el antibiótico.

4.4. 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, las sulfonamidas inhiben la dihidropteroato sintetasa, una enzima esencial en la síntesis de ácido fólico que las bacterias necesitan para la síntesis de precursores de ADN. Sin embargo, algunas bacterias pueden utilizar una vía metabólica secundaria y de esa manera sobrevivir. Además, puede ocurrir que determinados plásmidos R porten genes de resistencia a las sulfonamidas, que codifican una dihidropteroato 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.

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. Existen métodos fenotípicos y genotípicos dependiendo del microorganismo, de la droga, del mecanismo de resistencia y de la precisión con la que se necesite la información.

5.1. Métodos fenotípicos de detección

5.1.1. Detección de BLEEs

Las betalactamasas de espectro extendido tienen la particularidad de ser inhibidas por inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam). 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'' (Figura 54a). Otro ejemplo de mecanismo que se manifiesta mediante la formación de un ``huevo'', son las carbapenemasas que son inhibidas por EDTA.

5.1.2. 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 ejemplo: 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 (Figura 54b). Este bioensayo 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.

5.1.3. Detección rápida de carbapenemasas mediante la técnica de Blue - Carba.

Se preparan dos tubos Eppendorf, en uno de ellos se agrega una solución de imipenem, $ZnSO_4$ y azul de bromotimol, en el otro tubo se agrega solo el $ZnSO_4$ y el azul de bromotimol sin el imipenem. Se les inocula una o dos ansadas del microorganismo en estudio a cada tubo y se incuban por 2 horas. Luego de la incubación si la bacteria en estudio produce carbapenemasas se produce la hidrólisis del imipenem (en el tubo correspondiente) y una consecuente modificación del pH. La reacción se pondrá de manifiesto por el viraje del indicador desde el azul al amarillo. El tubo sin el imipenem debería permanecer sin cambios (tubo control de reacción), pero si vira el indicador debe considerarse negativa la producción de imipenem (estos casos son excepcionales y solo para algunas bacterias). Se realizan controles positivos y negativos en paralelo con cepas ATCC. La detección de betalactamasas mediante la utilización de sustratos cromogénicos de la enzima (por ejemplo, nitrocefin) es otro ejemplo de método rápido de detección fenotípica.

5.1.4. 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 grampositivos). Se coloca un disco de papel impregnado con clindamicina la cual es afectada por el mecanismo de resistencia, pero, como no es una buena inductora del mismo, 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 (Figura 54c). Esta misma metodología se utiliza para detectar betalactamasas de tipo AmpC.

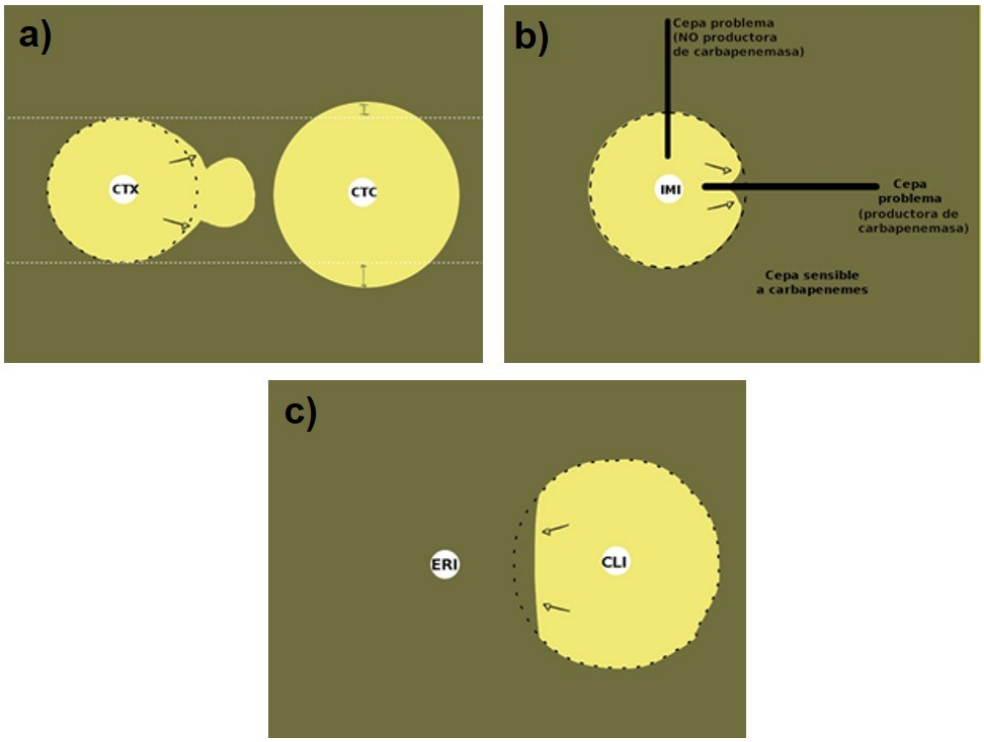


Figura 54. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia. **a)** detección de BLEEs, **b)** bioensayo de Masuda y **c)** D-test: CTX: cefotaxima, CTC: cefotaxima-clavulánico, IMI: imipenem, ERI: eritromicina, CLI: clindamicina. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

5.2. Métodos genotípicos de detección

Los métodos moleculares son herramientas importantes para el diagnóstico rápido de cepas resistentes en pacientes, aunque no se utilizan de forma rutinaria. Su uso principal es en la vigilancia epidemiológica de la resistencia a antibióticos. Han sido fundamentales para comprender la resistencia a la meticilina en *S. aureus*, la diseminación de enterococos resistentes a la vancomicina y la detección de resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*, entre otros. La resistencia puede deberse tanto a la adquisición de nuevos genes como a mutaciones, aunque la presencia de genes de resistencia no siempre implica que estos sean expresados o funcionales.

Helicobacter pylori es un bacilo gram negativo que puede causar gastritis crónica, úlceras pépticas y cáncer gástrico. La resistencia a macrólidos como la claritromicina se debe a mutaciones puntuales en los genes que codifican el ARNr 23S: una adenina es reemplazada por una guanina en las posiciones 2143 o 2142 o por una citosina en posición 2143. Una forma de detectar estas mutaciones, es mediante RFLP[2] amplificando un fragmento de 425

[2] Repasar las técnicas moleculares del TP N° 5 Identificación genotípica.

pb del ADN que codifica la fracción 23S, luego se realiza el corte con enzimas de restricción *Bsa* I (A2143G) o y *Mbo* II (A2142G) para determinar el tipo de mutación puntual que le otorga resistencia a este antibiótico (Figura 56).

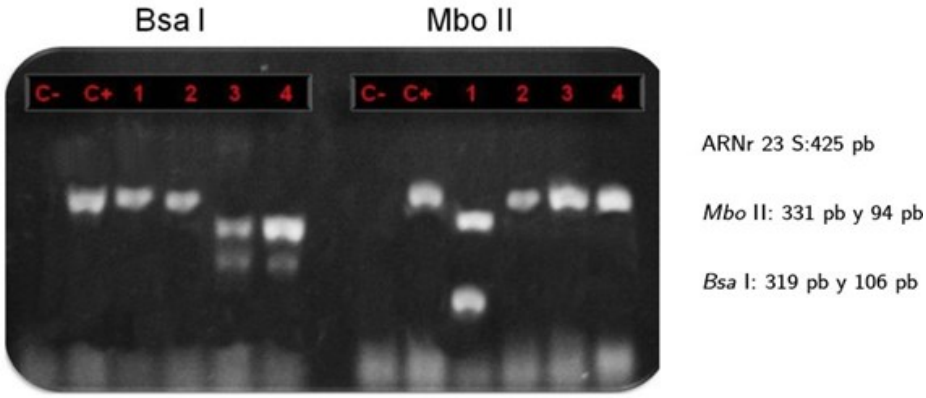


Figura 56. Detección de resistencia a claritromicina en *Helicobacter pylori* mediante RFLP. **Bsa I (derecha)**: las calles 1 y 2 (sin corte) corresponden a cepas de *H. pylori* sensibles, mientras que las calles 3 y 4 (con corte) corresponden a cepas resistentes. **Mbo II (izquierda)**: el fragmento de la calle 1 proviene de una cepa resistente y las calles 2, 3 y 4 provienen de una cepa sensible.

BIBLIOGRAFÍA

Di Conza, J. A., y Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 63-78. ISSN: 0325-7541.

Gilmore B. F., Denyer, S. P. (Eds.). (2023). *Hugo & Russell´s Pharmaceutical Microbiology* (9ª Ed). Oxford, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.

James, H. J., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S. y Warnock, D. W. (2015). *Manual of clinical microbiology* (11ª Ed.). Washington, DC: ASM Press.

Klesiewicz, K., Nowak, P., Karczewska, E., Skiba-Kurek, I., Wojtas-Bonior, I., Sito, E., & Budak, A. (2014). PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori strains. Acta Biochimica Polonica, 61(2).

Lodish H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Scott, M. P. (2005). *Biología celular y molecular* (5ª Ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

Pasteran, F., Veliz, O., Ceriana, P., Lucero, C., Rapoport, M., Albornoz, E., Gomez, S., Corso, A., y ReLAVRA Network Group (2015). Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 53(6), 1996–1998.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2017). *Introducción a la Microbiología* (12ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

Willey, J. M., Klein, D. A., Harley, J. P., Prescott, L. M., Sherwood, L. y Woolverton, C. J. (Ed). (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana de España.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Detectar fenotípicamente bacterias resistentes en Placas de Petri.
2) Detección de la resistencia a claritromicina (macrólido) de *H. pylori* mediante el empleo de polimorfismo de largos fragmentos de ADN.

PARTE PRÁCTICA

1. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia

Se observarán durante la jornada de trabajo práctico distintas placas con métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia (AmpC, BLEEs, carbapenemasas) que serán analizados y discutidos grupalmente.

2. Detección genotípica de mecanismos de resistencia

2.1. Extracción de ADN

Modificación de Z Ge and Taylor DE (Figura 55):

1) Resuspender las células de media caja de cultivo con buen desarrollo de *H. pylori* en 200 µl de buffer (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8).
2) Mezclar con tips amarillos. 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 vórtex.
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 ºC conservado a –20 ºC). 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 añadir 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.

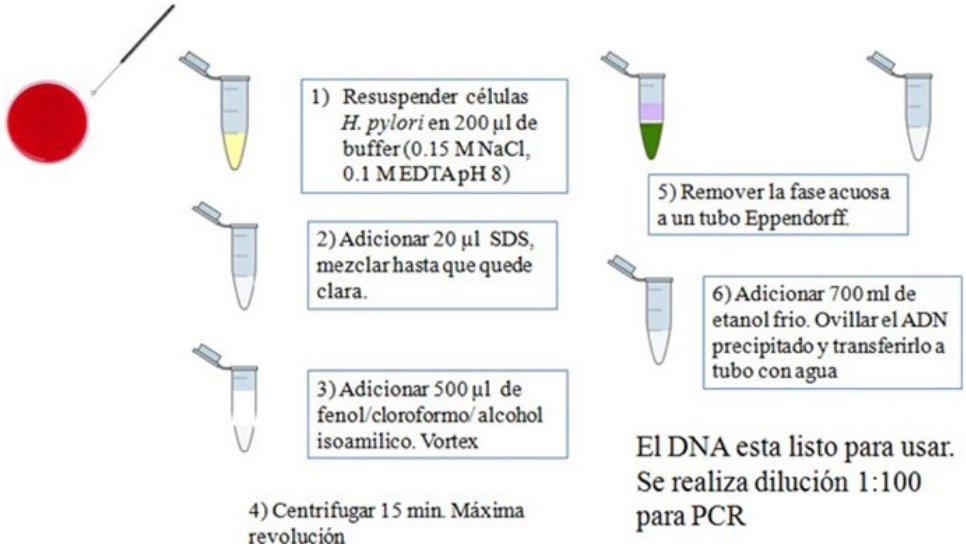


Figura 55. Técnica de extracción de ADN a partir de cultivos de *H. pylori*. Nota. Imagen reproducida desde *Helicobacter pylori* protocols. Humana Press Editorial.

2.2. Preparación de la Master Mix

Preparar Master Mix según tabla 16 para 4 muestras multiplicar todos los volúmenes, excepto el ADN.

Tabla 16. Componentes de la Master Mix para una muestra

	Concentración	**1 Muestra (µl)**
Buffer	1X	5
Mg2+	2,5 mM	2,5
dNTPs	0,2 mM	5
Primer Hp23 Forward	1 M	5
Primer Hp23 Reverse	1 M	5
Taq polimerasa	1 U	0,2
H_20 ultrapura		22,3
ADN molde		5
Volumen total		**50**

Luego distribuir 45 µl de la Master Mix en un Eppendorf y agregar 5 µl del ADN extraído para obtener un volumen final de 50 µl.

2.3. Amplificación por PCR

Una vez obtenido el ADN de *H. pylori*, se realiza una PCR para la amplificación específica del fragmento de 425 pb correspondiente al gen 23S.

- Desnaturalización inicial 94 °C - 10 min
- 39 *ciclos de:*
    - Desnaturalización: 94 °C - 1 min
    - Hibridación: 55 °C - 1 min
    - Extensión: 72 °C - 1 min
- Extensión final: 72 °C - 10 min

2.4. 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 ARNr, el producto amplificado en la reacción de PCR anterior se somete a cortes con enzimas de restricción (Tabla 17)

- Mbo II: A2142G, temperatura óptima 37 °C.
- Bsa I: A2143G, temperatura óptima 50 °C.

Tabla 17. Corte con enzimas de restricción

Componente	**1 muestra (µl)**
H_2O ultrapura	7,5
Amplificación gen 23S ARNr	10
Buffer de enzima (I o II)	2
Enzima (I o II)	0,5
Total	**20**

Dejar toda la noche a temperatura correspondiente para el corte con la enzima:

2.5. Corrida electroforética

Revelar los fragmentos obtenidos mediante corrida electroforética en un gel de agarosa al 1,8 % hidratado con buffer tris-borato-EDTA 1X.

1) Preparar un gel de agarosa al 1,8 % en buffer de corrida tris-borato-EDTA. Adicionar 1 µl Gel red (concentración madre 5 mg/ml).
2) Sembrar en cada pocillo, 10 - 12 µl de las muestras amplificadas.
3) Someter a una corrida electroforética con voltaje constante (80 voltios) durante 45 min.

2.6. Interpretación de los resultados finales

Observar en transiluminador los fragmentos correspondientes a los cortes, debiéndose observar resultados similares a los de la Figura 56:

- ➔ Las calles que presentan dos bandas indican que el amplicón 23S se fragmentó por la acción de las enzimas de restricción (*Bsa I* o *Mbo II*)*, lo cual indica que* presentan mutación y son resistentes a claritromicina.
- ➔ Las calles con una sola banda indican que la cepa no presenta mutación, ya que no se detecta corte con alguna de las 2 enzimas, por ende, estás cepas son sensibles al macrólido.

12 Producción de antimicrobianos naturales de interés farmacéutico

OBJETIVOS

1) Diferenciar los distintos tipos de metabolitos de interés farmacéutico producidos por microorganismos.
2) Entender los pasos involucrados en el proceso de búsqueda y desarrollo (clásico y moderno) de nuevos antibióticos a partir de microorganismos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

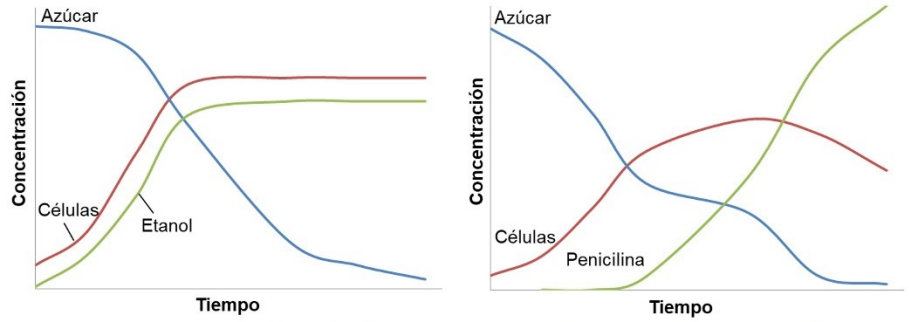
1. Metabolismo microbiano

Las nociones de la Microbiología Industrial han permitido a la industria farmacéutica obtener metabolitos microbianos útiles para la producción de medicamentos, especialmente antimicrobianos con gran impacto en la salud. Algunos de estos compuestos también son eficaces como antitumorales o inmunosupresores, como la bleomicina, ciclosporina A y tacrolimus, producidos por diversas cepas de actinomicetos (*Streptomyces*). Para lograr altos rendimientos productivos, se manipulan genéticamente los microorganismos, ya que las cepas salvajes, aisladas de la naturaleza, los suelen producir en bajas cantidades.

La fabricación industrial de estos productos se realiza mediante el cultivo a gran escala de microorganismos, proceso conocido como **fermentación**, que puede ser aerobio o anaerobio. Al efectuar fermentaciones, en cultivos discontinuos, los microorganismos son capaces de producir dos clases diferentes de metabolitos (Figura 57):

1) *Metabolitos primarios (asociados al crecimiento)*: su producción máxima ocurre durante la fase exponencial o logarítmica de crecimiento y son primordiales para el mantenimiento de la vida microbiana. Un ejemplo es la producción de etanol durante la fermentación alcohólica de levaduras como se describe en el trabajo práctico de cinética microbiana. Otros metabolitos primarios de interés comercial son los aminoácidos, vitaminas, enzimas, butanol, ácidos orgánicos, entre otros. (Figura 57a).
2) *Metabolitos secundarios (no asociados al crecimiento)*: son sustancias cuya síntesis comienza durante el final de la fase exponencial y se acumulan durante la fase estacionaria (Figura 57b). Son los más importantes desde el punto de vista industrial y reúnen las siguientes características:
    - No son esenciales para el crecimiento y la reproducción microbiana.

- Su producción depende de las condiciones de la fermentación, principalmente la composición del medio de cultivo y ocurre generalmente en respuesta a una restricción de nutrientes.
- Son moléculas orgánicas complejas que requieren un gran número de reacciones enzimáticas para su síntesis y sus precursores provienen del metabolismo primario, por lo tanto, las rutas biosintéticas están relacionadas.
- A menudo se producen como un grupo de estructuras químicas similares. Por ejemplo, Gramicidina D producida por *Brevibacillus brevis* corresponde a una mezcla de seis péptidos (de 15 aminoácidos) denominados gramicidinas A, B, C y cada isoforma presenta dos variantes dependiendo del aminoácido ubicado en primera posición (isoleucina o valina).
- Son característicos y restringidos solo a algunas especies de microorganismos.



(a) Formación de etanol (metabolito primario) por *S. cerevisiae*.

(b) Producción de penicilina (metabolito secundario) por *P. chrysogenum*.

Figura 57. Producción de metabolitos primarios y secundarios en cultivo discontinuo. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2. Búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos

Desde que Alexander Fleming accidentalmente descubriera la penicilina en 1928, los inhibidores del crecimiento microbiano han revolucionado las ciencias médicas. Generalmente, son metabolitos secundarios obtenidos de un grupo de hongos y bacterias relativamente restringido, siendo los principales productores los hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Acremonium* junto a los actinomicetos (un grupo extenso de bacterias filamentosas grampositivas, donde *Streptomyces* es el género más importante). Otros taxones bacterianos como *Bacillus* y *Pseudomonas* también son capaces de secretar dichos compuestos (Tabla 18).

Tabla 18. Antibióticos naturales producidos por microorganismos.

Antibióticos	**Hongo**	**Actinomiceto**	**Bacteria**
Betalactámicos			
Penicilina	*Penicillium chrysogenum*		
Cefalosporina C	*Acremonium chrysogenum*		
Griseofulvina	*Penicillium griseofulvin*		
Macrólidos			
Eritromicina		*Saccharopolyspora erythraea*	
Aminoglucósidos			
Estreptomicina		*Streptomyces griseus*	
Neomicina		*S. fradiae*	
Tetraciclinas			
Clortetraciclina		*S. aureofaciens*	
Oxitetraciclina		*S. rimosus*	
Polienos			
Nistatina		*S. noursei*	
Anfotericina B		*S. nodosus*	
Péptidos			
Bacitracina			*Bacillus licheniformis*
Gramicidina D			*Brevibacillus brevis*
Lipopéptidos			
Polimixina B			*Paenibacillus polymyxa*
Daptomicina		*S. roseosporus*	
Glucopéptidos			
Vancomicina		*Nocardia orientalis*	

Estos metabolitos antimicrobianos se han transformado en uno de los principales productos biotecnológicos debido a que su complejidad estructural requiere de procesos fermentativos que no pueden ser reemplazados por la síntesis química. Sin embargo, la optimización de algunas propiedades tanto farmacocinéticas como farmacodinámicas requieren modificaciones químicas dando origen a fármacos semisintéticos que forman distintas generaciones dentro de cada familia.

Los programas tradicionales de búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos implican el aislamiento de cepas microbianas a partir de recursos naturales (suelo, agua, aire, entre otros). Sin embargo, desde hace tiempo existe una alta probabilidad de obtener compuestos ya conocidos por lo cual se requieren estrategias modernas de búsqueda.

En la Figura 58 se pueden observar las etapas más relevantes, aunque no necesariamente secuenciales, que requiere el desarrollo de nuevos antibióticos a partir de un enfoque tradicional.

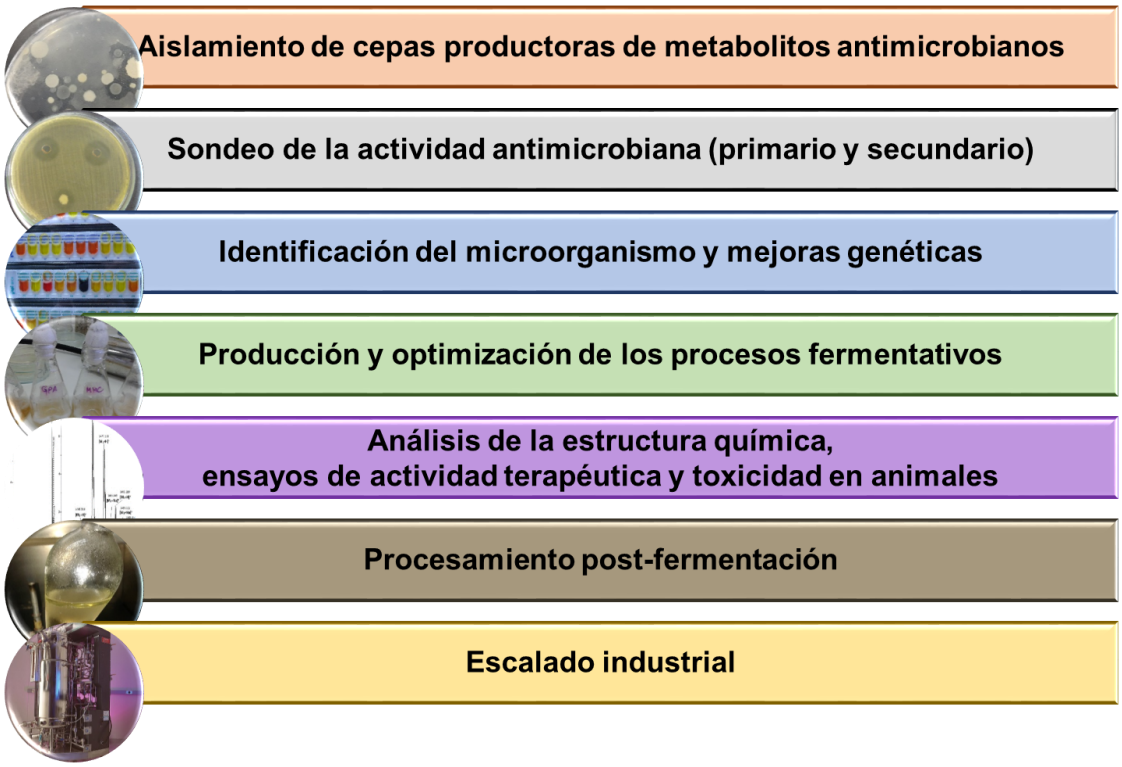


Figura 58. Etapas del desarrollo de nuevos antibióticos obtenidos a partir de microorganismos. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.1. Aislamiento de la cepa productora

Aunque la industria farmacéutica actualmente realiza 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 o sondeo 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 (suelo, agua, plantas, desechos,

aire, entre otros) y la recuperación del microbioma de la muestra en medios agarizados hasta la obtención de cultivos puros para evaluar posteriormente la actividad antimicrobiana de cada cepa aislada. En algunos casos pueden evidenciarse halos de inhibición por parte de algunas colonias directamente sobre el medio de cultivo sólido que facilitan el criterio de selección de cepas (Figura 59).

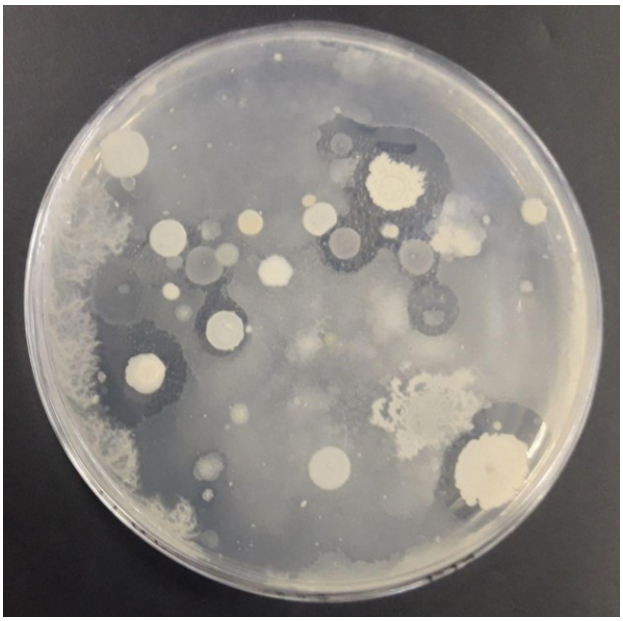


Figura 59. Aislamiento inicial de cepas productoras de antibióticos. Se observan colonias que ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos que lo rodean. Nota. Imagen tomada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.2. 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 puede realizarse mediante dos tipos de aproximaciones:

2.2.1. Sondeo primario o preliminar

Existen varios métodos que consisten en enfrentar dos microorganismos, un productor y un indicador, en medios de cultivo sólido (Figura 60):

1) *Método de entrecruzamiento de estrías*: En una placa de Petri con medio de cultivo sólido, se realiza una estría de la cepa productora de antibiótico, luego se estrían perpendicularmente los microorganismos indicadores (Figura 60a). Los microorganismos sensibles al antibiótico (cepas 1 a 4) se observan como estrías más cortas que las cepas resistentes las cuales se acercan a la estría central (cepas 5 y 6). Este método es ventajoso para evaluar simultáneamente en una misma placa el efecto de los metabolitos antimicrobianos producidos contra varios microorganismos indicadores, permitiendo de este modo conocer el espectro de acción. Si la cepa productora crece lentamente la placa

con la estría central se pre incuba durante unos días y luego se estrían los indicadores que generalmente crecen en 24 horas. Una modificación del método se conoce como *método de estrías radiales*, en este caso la cepa productora se inocula en forma puntual en el centro de la placa y los indicadores se estrían alrededor en forma radial.

2) *Método de gota en agar*: Primero se realiza un césped del indicador sobre el medio sólido y luego se inocula en forma puntual con ansa o bien se siembra un pequeño volumen (10 µl) de la cepa productora. Luego de la incubación aquellas cepas capaces de liberar antibióticos presentarán halos de inhibición alrededor del crecimiento (Figura 60b). Esta técnica permite evaluar varias cepas productoras contra un único microorganismo indicador.
3) *Método de taco en agar*: Primero se realiza el césped de la cepa productora en una placa con un medio óptimo para su crecimiento y para la producción del antimicrobiano. Luego, se cortan tacos con un sacabocado que serán depositados sobre otra placa que contiene el microorganismo indicador. Luego del periodo de incubación se observan halos de inhibición alrededor del taco (Figura 60c). Este método es útil cuando los microorganismos productor e indicador no pueden crecer en el mismo medio de cultivo.

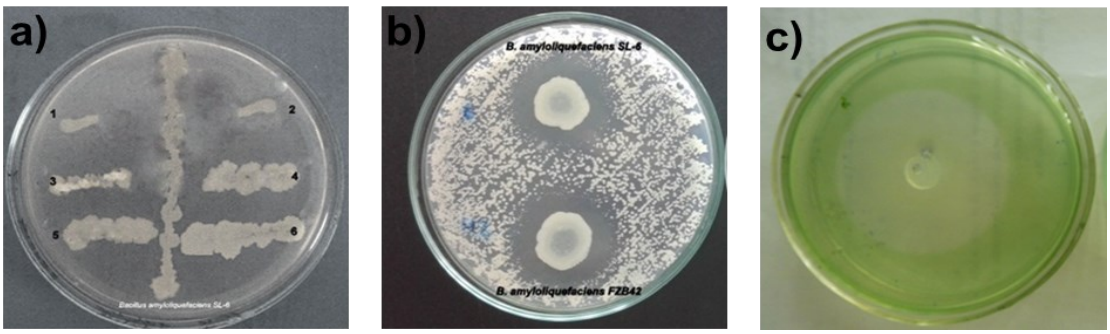


Figura 60. Sondeo primario de actividad antimicrobiana de *Bacillus velezensis* SL-6. **a)** Entrecruzamiento de estrías, **b)** Método de gota en agar para detectar actividad contra *Candida y* **c)** Método taco en agar para detectar efecto alguicida contra *Microcystis*. Nota. Imágenes tomadas por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.2.2. Sondeo secundario-Evaluación de sobrenadantes de cultivo

Aquellos microorganismos que demostraron su capacidad antimicrobiana en el sondeo primario son cultivados en caldos cuya composición permite el crecimiento celular y la producción de antibióticos. Luego del periodo de incubación se descarta la biomasa celular por centrifugación y así obtener sobrenadantes libres de células donde el antibiótico se encuentra disuelto. En el caso particular de microorganismos esporulados también deben separarse las esporas del sobrenadante mediante procesos de filtración. De este modo se elimina la posibilidad de que una espora germine en el medio sólido liberando antibióticos que no fueron secretados en el medio líquido inicial.

1) *Técnicas de difusión en placa*: se utilizan diferentes metodologías para dosificar el sobrenadante. En todos los casos se utilizan placas de Petri cuyo medio de cultivo sólido es previamente sembrado con un microorganismo indicador en forma de césped (Figura 61).
   a) *Difusión en discos*: se coloca un pequeño volumen de sobrenadante en reservorios (discos) que luego se colocan sobre la placa sembrada (Figura 61a).
   b) *Difusión en hoyos o pocillos*: el sobrenadante se descarga directamente en pocillos efectuados con un sacabocado sobre el medio de cultivo agarizado (Figura 61b).
   c) *Difusión por gota*: una pequeña gota (10 µl) del sobrenadante se coloca directamente sobre la placa de medio agarizado (Figura 61c).

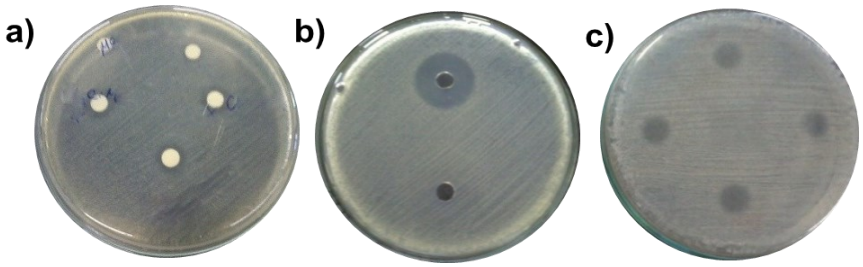


Figura 61. Sondeo secundario de actividad antimicrobiana **a)** Difusión en disco **b)** Difusión en pocillos y **c)** Difusión por gota. Nota. Imágenes tomadas por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2) *Bioautografía*: existen varias técnicas de bioautografía y en todos los casos la principal característica es combinar la cromatografía plana (en papel o en capa fina) con el método de difusión en placa de agar. Primero se realiza la cromatografía sembrando un volumen de extracto orgánico proveniente del sobrenadante de cultivo. Luego de desarrollar la cromatoplaca con una fase móvil y dejarla secar, el revelado por difusión se podrá realizar de dos formas:
   a) *Contacto directo*: consiste en apoyar la cromatoplaca sobre una placa de Petri sembrada con el indicador durante un tiempo determinado y se retira (Figura 62).
   b) *Inmersión*: se coloca la cromatoplaca en una placa estéril vacía y luego el medio mantenido a 45-50 °C y previamente inoculado con el indicador, se dispensa dentro de la placa y se deja solidificar. Para lograr un mayor contraste en los halos de inhibición suele incorporarse sales de tetrazolio que se tornan púrpura cuando la bacteria crece, permaneciendo incoloro en los lugares donde se encuentra la inhibición.

En ambos casos luego de la incubación se verán zonas de inhibición y podrán calcularse sus respectivos Rf que son característicos del metabolito. Con estas técnicas se logra una separación preliminar de los metabolitos presentes y permite reconocer qué compuestos son realmente bioactivos.

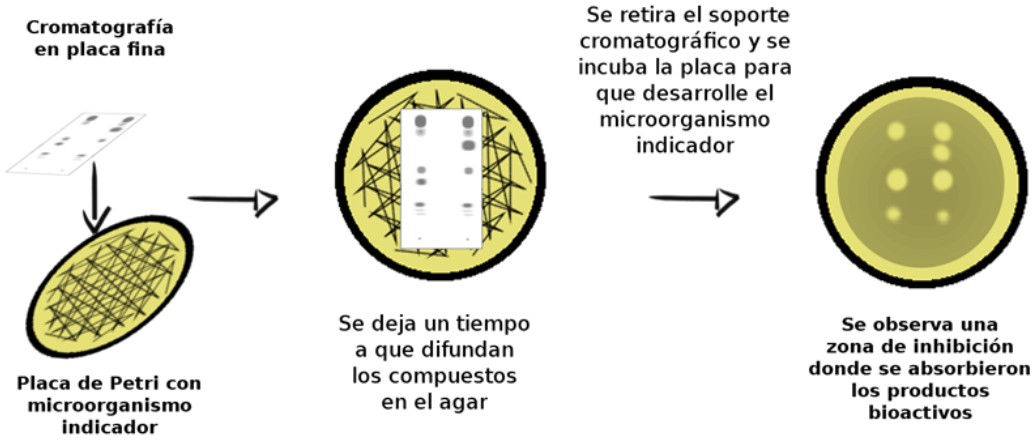


Figura 62. Bioautografía por contacto directo. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2.3. Identificación del microorganismo y mejoramiento genético

La identificación de la cepa productora de antibióticos se realiza a través de una serie de observaciones microscópicas y pruebas bioquímicas y moleculares que permiten su caracterización fenotípica y genotípica de acuerdo a lo descrito en los Trabajos Prácticos respectivos.

La productividad potencial del antibiótico (o cualquier metabolito secundario) es controlada por su genoma, en general las cepas aisladas (silvestres) presentan muy bajos niveles de producción. Por ello, existen métodos de mejoramiento genético de las cepas para incrementar los rendimientos del antibiótico de interés y para suprimir la producción de metabolitos no deseados ayudando al proceso de purificación.

La obtención de cepas modificadas genéticamente puede efectuarse mediante tres métodos:

1) *Selección natural de variantes:* en este caso ocurre una mutación espontánea donde se desconoce el elemento responsable de la mutación. Las variantes mutadas se obtienen por selección en medios de cultivos conteniendo drogas o metales y se detectan aquellos cambios en las características morfológicas de las colonias que se asocian a mayor o menor productividad.
2) *Mutación inducida:* involucra la mutación forzada en el ADN microbiano utilizando un agente mutágeno físico (radiaciones UV, rayos X) o químico (ácido nitroso, N-metil-N'-nitro- N-nitrosoguanidina, 5-bromouracilo, naranja acridina). Luego se seleccionan los mutantes sobrevivientes 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. Este método ha sido empleado en la edad dorada de los antibióticos para obtener cepas productoras de alto rendimiento.

3) *Recombinación genética:* implica la reagrupación de las potencialidades de distintas variantes con el objeto de seleccionar la mejor combinación de genes que codifican la producción de determinado metabolito.

2.4. Análisis de la estructura química, ensayo de actividad y toxicidad en animales

La identificación de la estructura química se realiza mediante el uso combinado de diversas técnicas analíticas instrumentales como Resonancia Magnética Nuclear y espectroscopia de masas e infrarrojo. Respecto de la toxicidad y eficacia terapéutica, menos del 1% de los compuestos ensayados superan los ensayos clínicos alcanzando la seguridad y eficacia terapéutica aceptables para la producción comercial.

2.5. Producción y optimización de los procesos fermentativos

La expresión microbiana de los compuestos antimicrobianos depende de factores nutricionales y ambientales cuya manipulación permite optimizar los rendimientos y la productividad (Tabla 19).

Tabla 19. Factores que influencian la expresión de compuestos antimicrobianos.

Factores nutricionales	Factores físico-químicos
Fuente de carbono	Presión parcial de oxígeno
Fuente de nitrógeno	Temperatura de incubación
Fosfato inorgánico	pH
Sales inorgánicas	
Metales	
Precursores	

La composición del medio de cultivo afecta la producción de antibióticos por interferencia de mecanismos de control metabólico o por su rol como precursores de las vías biosintéticas. En cambio, las condiciones físico químicas del proceso fermentativo influyen indirectamente sobre la producción por regulación de la velocidad de crecimiento microbiano.

2.5.1. Fuente de carbono y nitrógeno

La regulación por represión catabólica ocurre en la producción de diversos antibióticos como penicilina, cefalosporina C, neomicina entre otros, cuando el medio de cultivo contiene azúcares que son metabolizados rápidamente, principalmente glucosa. Es usual que la producción comience luego del consumo casi completo de dicha fuente extendiendo el tiempo del proceso fermentativo. Esta dificultad puede evitarse cambiando la fuente de carbono por una de lenta metabolización como la lactosa, por ejemplo.

También existe el mismo tipo de regulación respecto de la fuente de nitrógeno en la producción de eritromicina, novobiocina y cefamicina entre otros antibióticos. Además, otro parámetro que debe optimizarse es la relación entre carbono y nitrógeno (C/N) para mejorar los rendimientos.

2.5.2. Fosfatos inorgánicos

Las sales de fosfatos se agregan por su acción buffer para mantener el pH, sin embargo, en altas concentraciones aceleran la respiración y el crecimiento, generando una reducción en la concentración de antibióticos. Existe un tipo de regulación que se conoce como estado de carga energético y ha sido observado en la producción de clortetraciclina donde altas concentraciones de fosfato aumentan la concentración de ATP, inhibiendo la producción del antibiótico. Otro ejemplo, es la influencia variable de la concentración de fosfatos inorgánicos en la producción de cefalosporina C por *Streptomyces clavuligerus*.

2.5.3. Metales traza (oligoelementos)

Poseen un efecto positivo o negativo sobre la producción dependiendo de la concentración en el medio de cultivo. Por ejemplo, el ion Mn^{2+} cumple una importante regulación en la esporulación y producción de antibióticos en el género *Bacillus*, en cambio en los hongos es importante la influencia de Zn^{2+} y en actinomicetos se debe optimizar las concentraciones de Fe^{2+} y Zn^{2+}.

2.5.4. Precursores e inductores

Son sustancias que se adicionan para incrementar el rendimiento del antibiótico porque, son compuestos intermediarios que limitan la síntesis, inducen una enzima necesaria en la biosíntesis o ambas cosas. Por ejemplo, la adición de fenilacetato de sodio aporta grupos fenilos para la producción de penicilina G, mientras que si se adiciona fenoxiacetato de sodio se favorece la producción de penicilina V. Otro ejemplo es la incorporación de cloro en el medio que influye en la producción de clortetraciclina y griseofulvina. Finalmente, metionina influye como precursor en la síntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* aportando azufre y además actúa como inductor enzimático cuando se incorpora en la fase exponencial de crecimiento.

2.6. Procesamiento post-fermentación

Corresponde al conjunto de etapas empleadas en la separación y purificación de los metabolitos obtenidos durante la fermentación:

2.6.1. 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.

2.6.2. 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 inversa, microfiltración y ultrafiltración), extracción líquido-líquido con solventes orgánicos (acetato de etilo, butanol, diclorometano) y precipitación (sulfato de amonio, acetona, etanol, ácido clorhídrico), entre otros. La elección del método dependerá de la naturaleza del producto, minimizando la pérdida en las distintas etapas.

2.6.3. 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.

2.7. 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.

Uno de los ejemplos más estudiados es el escalado industrial de penicilina que requirió un cambio de cepa del original *P. notatum* hallado por Alexander Fleming a *P. chrysogenum*, el empleo de sistemas de cultivo discontinuos alimentados y un medio de cultivo con lactosa y licor de macerado de maíz.

3. Modernas estrategias en la búsqueda de nuevos antibióticos

Un factor clave que determina el éxito en cualquier programa de búsqueda de nuevos fármacos de origen microbiano consiste en emplear métodos y criterios que permitan reconocer rápidamente si nos encontramos con metabolitos ya conocidos. Este inconveniente es bastante común cuando se emplean métodos clásicos como el descrito previamente, es por ello que se ha definido “desreplicación” al conjunto de procesos necesarios para llevar a cabo dicha discriminación a fin de evitar esfuerzos redundantes. Brevemente, describiremos nuevas estrategias de búsqueda.

3.1. Minería genómica para detectar nuevos antimicrobianos

La minería genómica consiste en la secuenciación completa del genoma de los potenciales microorganismos productores y es una herramienta en pleno auge cuyo objetivo final es comparar la maquinaria biosintética entre cepas, es decir se comparar los genes que codifican la producción del metabolito de interés y si aparece un gen desconocido se estudia. Por lo tanto, constituye tanto una técnica de búsqueda de nuevos metabolitos y sirve para la desreplicación. Sin embargo, se dificulta su aplicación por su alto costo y porque requiere del conocimiento de herramientas bioinformáticas para realizar las comparaciones. Por ejemplo, el genoma de la cepa *B. velezensis* FZB42 contiene hasta ahora 10 conjuntos de genes que codifican la síntesis de metabolitos secundarios antibióticos y antifúngicos lo cual representa cerca de un 10% del genoma total.

3.2. Metagenómica ambiental

Otra herramienta que involucra la metagenómica consiste en extraer el ADN total de muestras ambientales, conocido como eDNA por sus siglas en inglés, sin necesidad de realizar cultivos microbianos. De este modo se accede a una mayor diversidad de organismos ya que muchos de ellos no crecen en condiciones artificiales, y se los conoce como microorganismos no cultivables. Luego los genes de interés se introducen en microorganismo heterólogos (ej.: *E. coli*).

3.3. Técnica “una cepa muchos compuestos”

Como ya se mencionó el metabolismo secundario está influenciado por las condiciones de cultivo. Cabe destacar que, la biosíntesis limitada de un microorganismo aislado y cultivado en condiciones artificiales se debe a que existen grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios que se mantienen silenciados en estas condiciones. De este hecho se nutre la técnica “una cepa muchos compuestos” (OSMAC, por sus siglas en inglés) que busca activar dichos genes modificando parámetros de cultivo. Una forma de activación consiste en co-cultivar la cepa productora con microorganismos competidores o bien adicionar factores bióticos, como por ejemplo células muertas. En todos los casos, para detectar moléculas nuevas, se obtienen los sobrenadantes en cada condición y se analiza el conjunto total de metabolitos, conocido como metaboloma utilizando técnicas de espectrometría de masas.

3.4. Biosíntesis combinatoria

Esta estrategia consiste en la creación de una molécula híbrida a través de la modificación genética de un microorganismo productor y la transferencia horizontal de genes. Este proceso ha dado origen a nuevas eritromicinas, espiramicinas, tetracenomicinas y péptidos no ribosomales.

3.5. Biología sintética

La aplicación de la ingeniería genética para la creación de nuevos sistemas biológicos o "células sintéticas" empleando partes biológicas (biopartes) de diferentes organismos.

BIBLIOGRAFÍA

Dougherty, T. J. y Pucci N. J. (Eds.). (2012). *Antibiotic discovery and development*. London, Reino Unido. Springer.

Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press.

Kurtböke, I. (Ed.). (2017). *Microbial Resources: from functional existence in nature to applications*. London, Reino Unido: Academic Press.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos* (14ª Ed.). Madrid, España: Pearson/Prentice-Hall Iberia.

Okafor, N. y Okeke, B. C. (2018). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology* (2ª Ed.). Enfield: Taylor and Francis.

Ratledge, C. y Kristiansen, B. (Eds.). (2006). *Basic biotechnology* (3ª Ed.). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Obtener un sobrenadante libre de células y esporas (SLCE) a partir de un cultivo discontinuo de una cepa de *Bacillus*.
2) Evaluar la actividad antimicrobiana de la cepa anterior sobre distintos microorganismos indicadores, mediante método de estría.
3) Detectar la actividad antagónica del SLCE, por método en pocillos, sobre aquellos microorganismos que resultaron sensibles.

PARTE PRÁCTICA

1. Producción de metabolitos en cultivos discontinuos

➔ *Microorganismo productor: B. velezensis SL-6*

➔ *Medio de cultivo de composición definida:* medio sintético mineral que contiene glucosa (10 g/l), ácido glutámico (5 g/l), bajas concentraciones de distintas sales y pH final 7.

➔ *Procedimiento del cultivo discontinuo:*

1) Subcultivar en un tubo de agar tripteína soya inclinado la cepa productora durante 20-24 horas a 30 °C.

2) Colocar 5 ml de solución fisiológica estéril o medio sintético mineral en el tubo y remover la biomasa formada hasta obtener una suspensión densa y homogénea. Este será el inóculo inicial.
3) Adicionar 0,6 ml de dicha suspensión en un Erlenmeyer indentado estéril con 30 ml de medio.
4) Cultivar en un agitador orbital con agitación a 200 rpm durante 24 horas a 30 °C (Figura 63).

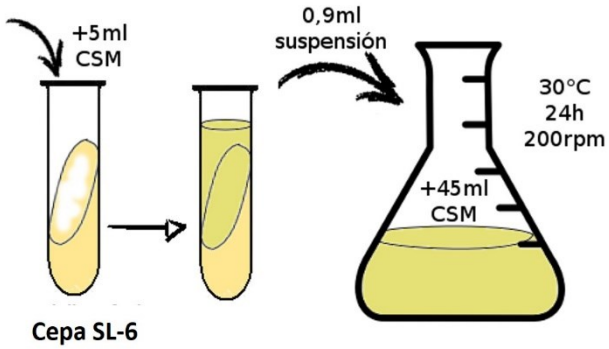


Figura 63. Cultivo discontinuo. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2. Obtención *del Sobrenadante libre de células y esporas (SLCE)*

1) Al finalizar el cultivo, colocarlo en tubos de centrífuga y centrifugar a 12.000 rpm, durante 20 min a 4 ºC para separar las células del líquido.
2) Filtrar el líquido obtenido por una membrana de 0,22 µ m de diámetro de poro.
3) Transferir el SLCE del equipo de filtración a tubos vacíos estériles, manteniendo en todo momento la técnica aséptica.

3. Sondeo primario de la actividad antimicrobiana por método en estría

➔ *Microorganismos indicadores*

- Bacterias: *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa*
- Levaduras: *S. cerevisiae, Rhodotorula* sp., *C. albicans*
- Mohos: *Penicillium* sp. *Rhizopus* sp.

➔ *Procedimiento del método en estría*

1) *Preparación de una suspensión de concentración estandarizada de los indicadores:* tomar una ansada a partir del tubo con agar inclinado (solo para bacterias y levaduras) y transferir a tubos con solución fisiológica estéril hasta ajustar la turbidez a 0,5 en la escala de McFarland (Figura 64a).
2) *Inoculación de los indicadores*

- *Bacterias:* sumergir un hisopo estéril en la suspensión microbiana 0,5 McFarland y descartar el exceso de líquido oprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo. Realizar

estrías muy juntas en tres direcciones distintas sobre placas de Petri con Agar Peptonado suplementado con Glucosa - APG(Figura 64b).

- *Levaduras:* realizar el mismo procedimiento que en bacterias sobre placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud (Figura 64c).
- *Mohos:* tomar una ansada de inóculo con ansa en anillo estéril y transferir directamente en forma puntual en el centro de la placa de Agar Papa (Figura 64d).

PRECAUCIÓN: Cada tipo de microorganismo se inocula en medios distintos.

3) *E*stría *de la cepa productora de metabolitos:* tomar con un ansa en anillo, inóculo de *B. velezensis* SL-6 y realizar una estría de 1 a 2 cm de longitud, en las placas previamente sembradas con cada indicador (Figura 64).

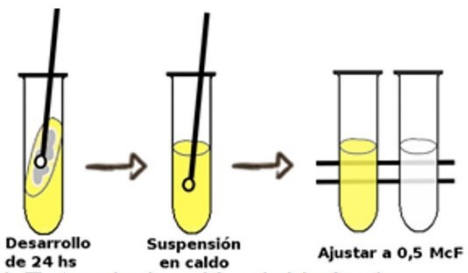
4. Sondeo secundario por método de difusión en pocillo (para bacterias y levaduras)

Luego de finalizar con el método anterior, realizar dos pocillos en cada placa de Petri, con un sacabocados estéril, y depositar en los mismos en forma aséptica 20 µl del sobrenadante libre de células y esporas (Figura 64b y c).

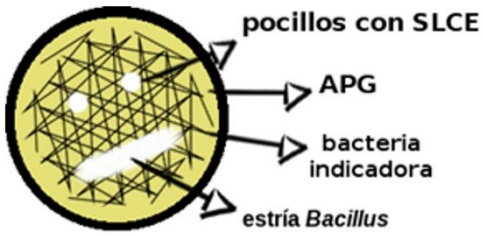
5. Incubación y lectura de los resultados

- Bacterias a 37 ºC durante 24 horas.
- Levaduras a 30 ºC durante 24-48 horas.
- Mohos a 30 ºC durante 5 a 7 días los mohos.

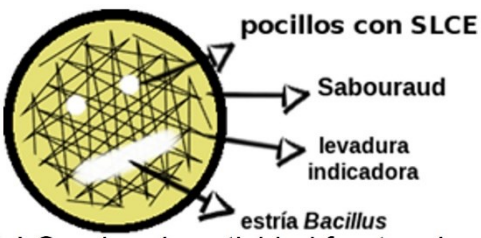
Observar la inhibición alrededor de la estría de la cepa SL-6 y los halos de inhibición alrededor de los pocillos. Determinar si los indicadores son sensibles o no a los metabolitos producidos por la cepa antagónica.



(a) Estandarización del inóculo



(b) Sondeo de actividad antibacteriana



(c) Sondeo de actividad frente a levaduras.

(d) Sondeo de actividad frente a mohos.

Figura 64. Sondeo primario y secundario de la actividad antimicrobiana de la cepa SL-6. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

13 Productos inmunológicos

OBJETIVOS

1) Diferenciar los distintos tipos productos inmunológicos con fines terapéuticos y profilácticos.
2) Entender los procesos de producción y control de cada tipo de producto inmunológico de acuerdo a lo establecido por la Farmacopea Argentina.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El concepto de medicamento engloba principalmente a las especialidades medicinales obtenidas por procesos de síntesis química (origen sintético), los productos biológicos y aquellos obtenidos por procesos biológicos y químicos combinados (semisintéticos). De acuerdo a la ANMAT, los medicamentos biológicos son derivados de fuentes naturales de origen humano, animal o microorganismos y son obtenidos por métodos biotecnológicos u otras tecnologías. Debido a su origen, son productos más complejos de caracterizar, requiriéndose para ello una descripción más detallada de su estructura y de su proceso de manufactura. Dentro del grupo de “biológicos” los productos inmunológicos incluyen a los anticuerpos policlonales de origen animal (inmunosueros) o humano (inmunoglobulinas), vacunas, anticuerpos monoclonales y otras moléculas derivadas de estos últimos.

1. Productos Hemoderivados

1.1. Inmunosueros

Según la Farmacopea Europea (2010) un inmunosuero animal para uso humano corresponde a líquidos o preparaciones liofilizadas, destinadas a una administración intravenosa o intramuscular, que contienen inmunoglobulinas enteras o fragmentos purificados obtenidos de suero o plasma de animales previamente inmunizados. Estos anticuerpos neutralizan o se unen específicamente a distintos antígenos como venenos (suero antiofídico polivalente y sueros anti veneno de escorpiones y arañas), toxinas bacterianas (antitoxinas botulínica, tetánica y diftérica), o de combinarse específicamente con bacterias, virus u otros antígenos y se administran en forma inyectable para el **tratamiento** de enfermedades establecidas o cuando hay elevadas probabilidades de contraer la enfermedad (ej. tétanos). Recientemente en nuestro país se han desarrollado anticuerpos policlonales equinos (suero equino hiperinmune) contra SARS-CoV-2 para el tratamiento de COVID-19.

Para su obtención se utilizan caballos, ovejas o cabras que son inmunizados por inyecciones repetidas del antígeno. Para el caso de la obtención de antitoxinas, inicialmente

se utiliza el toxoide (toxinas detoxificadas, pero aún inmunogénicas), 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 tratamiento enzimático y se fracciona con sulfato de amonio, en este paso se elimina albúmina. El **inmunosuero refinado** se filtra, se diluye a la concentración adecuada y se envasa. Las antitoxinas clásicas son la botulínica y tetánica contra toxinas específicas de *Clostridium botulinum* y *C. tetani* respectivamente, aunque han sido reemplazadas por las inmunoglobulinas humanas. En la Farmacopea Argentina no figuran monografías específicas de inmunosueros.

1.2. Inmunoglobulinas humanas

Estos preparados nacen en la década del cuarenta a partir de que Cohn purifica la inmunoglobulina G a partir de plasma humano por precipitación en etanol frío. De igual manera que los inmunosueros, las inmunoglobulinas humanas confieren inmunidad pasiva, pero al ser homólogas (origen humano) no sensibilizan ni causan hipersensibilidad. Además, otra ventaja es que son eliminadas de la sangre mucho más lentamente que los inmunosueros heterólogos prolongando el efecto. Se pueden obtener dos tipos de inmunoglobulinas, la polivalente (denominada en los vademécums como inmunoglobulina humana) y las específicas contra una patología en particular. La primera se indica en patologías como la agammaglobulinemia congénita, leucemia linfocítica crónica a células B, infección pediátrica por HIV, púrpura trombocitopénica idiopática en niños y adultos, enfermedades autoinmunes. Mientras que las inmunoglobulinas específicas se utilizan fundamentalmente para enfermedades para las cuales no existen tratamientos eficaces como los virus hemorrágicos, o más recientemente el virus Ébola y el SARS CoV-2. En la oficina de farmacia la más vendida corresponde a la inmunoglobulina humana tetánica formulada en combinación con el antígeno toxoide tetánico, de este modo se realiza una activación activa y pasiva de la inmunidad contra el tétanos.

Para su preparación, se hacen colecciones de plasma de no menos de 1000 donantes para inmunoglobulinas polivalentes, o un número menor para inmunoglobulinas específicas, siendo éstas hechas necesariamente utilizando sangre de pacientes convalecientes o de personas vacunadas recientemente. Luego, se separan las inmunoglobulinas por precipitación fraccionada con etanol en frío, con riguroso control de pH y fuerza iónica. La fracción de inmunoglobulina obtenida contiene monómeros, dímeros y polímeros agregados y se puede dispensar liofilizada o en solución salina a una concentración de 10 a 20 veces mayor a la del plasma natural. Las preparaciones van a diferir dependiendo de la vía de administración que

podrá ser intramuscular o endovenosa. En el segundo caso deben eliminarse los polímeros por ruptura proteolítica o precipitación de los agregados y el preparado debe contener al menos un 90% de IgG monomérica. Además, se puede agregar glicina como estabilizador, sulfato de aluminio como adyuvante y tiomersal como conservante. La Farmacopea Argentina codifica tres inmunoglobulinas humanas dentro del apartado de Hemoderivados: anti Hepatitis B, Normal y antitetánica.

1.3. Control de calidad de hemoderivados

La calidad de los inmunosueros e inmunoglobulinas 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 anticuerpo en UI/ml, mediante comparación de la capacidad de neutralizar una dosis fija de la preparación estándar calibrada en UI/ml del antígeno homólogo.

Entre los ensayos de seguridad más importantes podemos citar:

- ➢ Especie de origen animal (solo para inmunosueros).
- ➢ Origen humano por test de precipitación (para inmunoglobulinas).
- ➢ Determinación de pH y solubilidad.
- ➢ Ensayo de esterilidad y de piretógenos.
- ➢ Toxicidad anormal: se ensaya en animales.
- ➢ Contenido proteico total: se realiza una determinación del nitrógeno total.
- ➢ Composición de las proteínas por electroforesis de zonas.
- ➢ Distribución del tamaño molecular: Se analiza la proporción de monómeros, dímeros y polímeros de IgG mediante cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando una inmunoglobulina de referencia.
- ➢ Presencia de albúmina contaminante.
- ➢ Para las inmunoglobulinas intravenosas se debe determinar la osmolalidad, la actividad anticomplemento y debe realizarse el ensayo activador de precalicreína.

2. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (sufijo -mab, del inglés *monoclonal antibody*) son inmunoglobulinas producidas artificialmente por un solo tipo de Linfocitos B (clon celular) y están destinados al diagnóstico, tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, estudio de las interacciones patógeno-hospedero, la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas. Actualmente, es una de las áreas de mayor crecimiento en la industria biotecnológica y farmacéutica ya que en el mercado se encuentran cada vez más anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para uso en humanos.

2.1. Producción por la técnica del hibridoma

La producción de anticuerpos monoclonales fue posible gracias a la tecnología creada en 1975 por Georges Köhler (alemán) y César Milstein (argentino), por la cual recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984 (Figura 65). Consiste en la generación de una línea celular estable, secretora de un isotipo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno específico, fruto de la fusión de dos células diferentes. La primera célula es un linfocito B de un animal (ratón) previamente inmunizado con el antígeno de interés, aportando la memoria inmune y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. La segunda es una célula tumoral (mieloma) que le aporta la capacidad ilimitada de multiplicación. Juntas forman células híbridas llamadas hibridoma, una línea celular inmortalizada que por crecimiento en cultivo resulta una fuente casi inagotable de anticuerpos específicos.

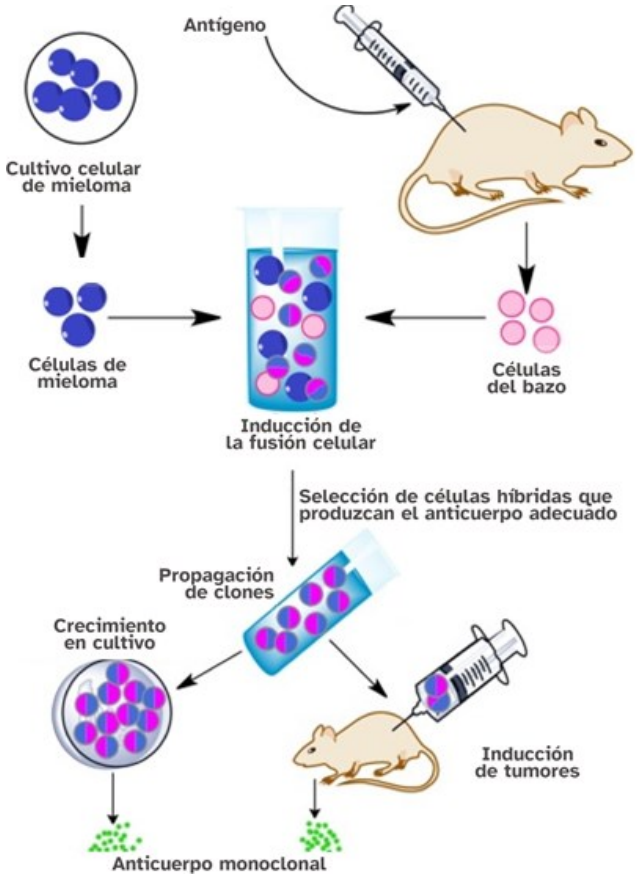


Figura 65. Producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas. Nota: Imagen de dominio público. Wikimedia Commons.

2.2. Tipos de anticuerpos monoclonales

El primer anticuerpo monoclonal terapéutico producido mediante esta tecnología fue muromonab (-o-), dirigido frente al antígeno CD3 que se expresa en la superficie de los linfocitos T y fue aprobado por la FDA en 1986 para el tratamiento del rechazo en pacientes trasplantados. Esta tecnología supuso un importante avance, pero presentaba la desventaja

de que, al provenir de genes de origen murino, inducía en los pacientes respuesta inmune contra el anticuerpo administrado, reduciendo su eficacia y provocando efectos adversos debido al origen no humano. La implementación de la ingeniería genética permitió la obtención de anticuerpos monoclonales recombinantes de segunda generación como solución a estas limitaciones (Figura 66). Estos anticuerpos se obtienen por una técnica de hibridoma modificada utilizando ratones transgénicos que contienen el gen que codifica inmunoglobulina humana específica o por la tecnología de despliegue de fagos.

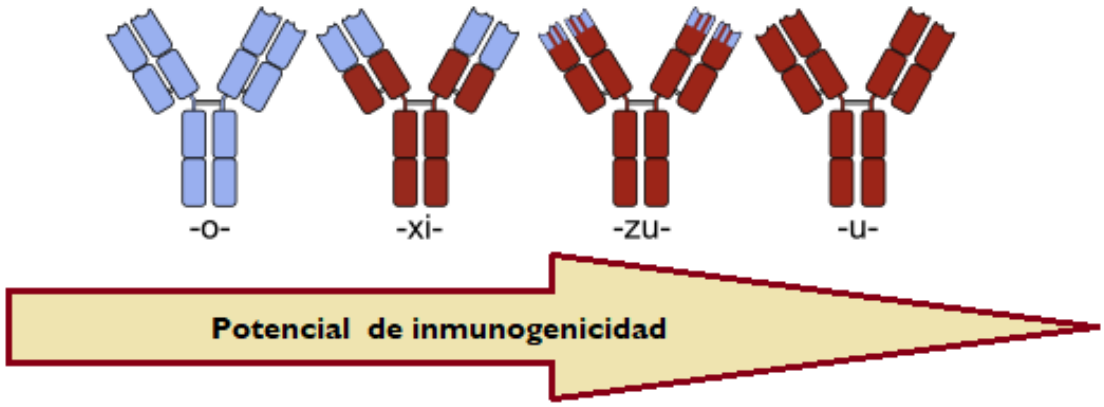


Figura 66. Tipos de anticuerpos monoclonales según su origen. Las regiones celestes en cada tipo de anticuerpo indica el origen murino y las regiones rojas indican el origen humano.Nota: Imagen de dominio público. Wikimedia Commons.

1) **Quiméricos (-xi-):** la región del anticuerpo que se une al antígeno (Fab) es de origen murino mientras que la fracción cristalizable (Fc) es de origen humano. Contienen aproximadamente un 65-90 % de cadena humana.
2) **Humanizados (-zu-):** la región Fc sigue siendo de origen humano y la región Fab es parcialmente humana y parcialmente murina. Contienen aproximadamente un 90-95% de cadenas humanas.
3) **Completamente humanos (-u-):** se reduce considerablemente el potencial inmunogénico debido a la ausencia del componente murino.

2.3. Nomenclatura

Dado la diversidad de anticuerpos dependiendo su origen y su diana, la OMS ha acordado una nomenclatura, según las Denominaciones Comunes Internacionales para productos farmacéuticos (Tabla 20).

Tabla 20. Nomenclatura de anticuerpos monoclonales. Algunos ejemplos.

Prefijo	Diana	Origen	Sufijo común	Ejemplo
aleatorio	Interleucina: (k) (ki) (kin)	Humano: (u)	-mab	**Ustekinumab**
	Sistema inmune: (l) (li) (lim)	Humanizado: (zu)		**Vedolizumab**
	Tumor: (t) (tu) (tum)	Quimérico: (xi)		**Rituximab**

3. Vacunas

Según la Farmacopea Argentina VII edición (2003), las vacunas para uso humano son **preparaciones que contienen sustancias antigénicas** (organismos vivos no virulentos, inactivados o antígenos nativos, detoxificados, polimerizados o conjugados) **capaces de inducir en el hombre una inmunidad activa específica** contra un agente infeccioso o toxina o antígeno elaborada por el mismo.

3.1. Clasificación de las vacunas

3.1.1. Vivas atenuadas

Son suspensiones de bacterias o virus vivos, cuya patogenicidad ha sido atenuada manteniendo su inmunogenicidad. Dicha atenuación se logra mediante numerosos repiques sucesivos o mutaciones en los genes específicos responsables de la virulencia del patógeno. Al estar vivo, el microorganismo vacunal reproduce los pasos de la infección, induciendo fuertemente las respuestas humoral y celular, desarrollando inmunidad de largo plazo con efectividades mayores al 95%, incluso luego de una sola dosis. Como contrapartida, existe el riesgo de que pueda ser transmitida a contactos estrechos del vacunado o que se produzcan mutaciones hacia formas más patógenas, por lo que no deben ser administradas a pacientes con alteraciones en la inmunidad. Ejemplos:

1) *BCG:* contiene *Mycobacterium bovis* para inducir respuesta inmunogénica contra *M. tuberculosis.*
2) *Contra rotavirus (oral):* contiene cepas atenuadas o serotipo reasociados humano-bovino.
3) *Contra el virus de la varicela:* cepa Oka.
4) *Sabin oral:* poliovirus atenuados tipo 1, 2 y 3.

3.1.2. Inactivadas

Se trata de suspensiones de bacterias o virus muertos e intactos, los cuales han sido tratados con agentes físicos o químicos (formalina o fenol). De este modo, no pueden crecer ni desarrollar la infección, pero aún son reconocidos por el sistema inmune induciendo la respuesta solo humoral de anticuerpos. Este tipo de vacunas se consideran más seguras que las vacunas vivas, siempre y cuando la inactivación sea completa. Ejemplos:

1) *Vacuna antigripal:* conjunto de cepas estacionales del virus influenza tipo A y B que tienen validez anual. Cada año la OMS indica qué cepas deben integrar la vacuna para la campaña anual de vacunación.
2) *Vacuna contra virus de la hepatitis A*: los virus son cultivados en cultivos celulares de células humanas diploides (ver apartado Producción de vacunas virales)
3) *Vacuna* antirrábica: cepa viral Wistar Pitman-Moore PM/WI 381503 - 3M.

3.1.3. Vacunas fraccionadas

Estas vacunas contienen sólo los fragmentos antigénicos del patógeno que mejor estimulan la respuesta inmune, pero disminuyendo marcadamente la reactogenicidad (respuestas inmediatas a corto plazo no deseadas de la vacuna). Existen diferentes tipos:

- ➔ **Toxoides o anatoxinas:** consiste en toxinas que sufren un proceso de detoxificación por tratamiento con formaldehído que evita la destrucción de la potencia inmunogénica y su reversión a toxina. Ejemplo: *Vacuna triple bacteriana:* toxoides tetánico, diftérico y pertúsico (para prevenir el tétanos (*Clostridium tetani*), la difteria (*Corynebacterium diphtheriae*) y la tos ferina (*Bordetella pertussis*).
- ➔ **Subunidades:** contienen fragmentos proteicos. Ejemplo: *Vacuna antigripal:* contiene hemaglutinina y neuraminidasa dos proteínas del virus influenza.
- ➔ **Recombinantes:** los genes que codifican el fragmento de interés se insertan en un sistema de expresión (bacterias, levaduras o cultivo de células animales) para crear un organismo recombinante. Luego, se efectúan cultivos a gran escala para producir el fragmento antigénico. Ejemplos:

1) *Vacuna recombinante contra virus de la Hepatitis B:* contiene una proteína de superficie (HBsAg) que se produce en levaduras recombinantes.
2) *Vacuna contra el meningococo (Neisseria meningitidis):* contiene proteínas de superficie recombinantes del serogrupo B producidas por *E. coli* recombinante.
3) *Vacuna contra el virus sincitial respiratorio (VSR)*: contienen la glicoproteína F estabilizada en pre-fusión de las variantes A y B del VSR producidas en células de ovario de hámster chinos (células CHO).

- ➔ **Partículas *virus-like* (VLP por sus siglas en inglés):** se asemejan a virus intactos pero carecen del material genético viral. Ejemplo: la *vacuna contra el papiloma humano (HPV)* es producida en una levadura recombinante, donde las proteínas virales se ensamblan a sí mismas en una partícula virus-like.
- ➔ **Polisacáridos:** constituidas por moléculas en la cápsula de un patógeno (la cual dificulta la fagocitosis en una infección natural). Dado que los polisacáridos son antígenos T-independientes no son muy inmunogénicos, y no son efectivos en niños de hasta 15-24 meses. Ejemplos: *Salmonella typhi* (polisacárido capsular Vi para prevenir la fiebre tifoidea).
- ➔ **Polisacáridos conjugadas:** los antígenos polisacáridos se combinan con proteínas o toxoides para inducir una respuesta inmune más fuerte. Ejemplos:

1) *Vacuna contra Haemophilus influenzae serotipo b:* contiene el polisacárido polirribosil-ribitol-fosfato (PRP) proveniente de la cápsula de la bacteria que se conjuga con el toxoide tetánico.

2) *Vacuna contra neumococos:* contiene polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* que se unen a una proteína transportadora.
3) *Vacuna contra meningococo:* posee oligosacáridos de distintos serogrupos de *N. meningitidis* conjugados con toxoide diftérico.

3.1.4. Vacunas génicas o de ácidos nucleicos

Son vacunas de última generación, cuyo desarrollo se vio impulsado durante la pandemia de COVID-19. Es importante destacar que tanto el ADN como ARNm tienen actividad adyuvante por sí mismos (ver apartado 3.4.2.).

- ➔ **Vacunas de ADN desnudo:** están constituidas por un plásmido bacteriano en el cual se han insertado los genes que codifican los antígenos proteicos de interés. Cuando la vacuna es administrada, los antígenos son sintetizados en las células del paciente y presentados del mismo modo que se produce en la infección natural, estimulando tanto la inmunidad humoral como celular. Una ventaja importante es que en la mayoría de los casos no necesita cadena de frío para su distribución y almacenamiento. Entre las desventajas que presenta podemos mencionar el riesgo de expresión de genes no deseados, como es el caso de genes de resistencia antimicrobiana en el plásmido (si no fueron previamente retirados), o de inducir anticuerpos anti ADN y autoinmunidad. Además, existe el riesgo teórico de integración del plásmido en el genoma del paciente. Para evitar este riesgo se manipula el ADN de modo que luego de ser transcrito induce finalmente la apoptosis de las células transfectadas. Aún no se comercializan pero hay diseños vacunales para prevenir los virus de Zika y SARS CoV-2 que se encuentran en ensayos clínicos.
- ➔ **Vacunas de ARNm:** las moléculas de ARNm, tanto desnudo como encapsulado en nanopartículas liposomales, luego de su administración pueden ser incorporadas por las células dendríticas y otras células, lo cual resulta en la síntesis de grandes cantidades de las proteínas codificadas por el ARNm y su posterior presentación junto a complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase I y II, activando ambas respuestas inmunitarias (humoral y celular). Debido a la inestabilidad térmica del ARNm, estas vacunas deben conservarse a muy bajas temperaturas (-80 °C). Ejemplos: vacunas anti SARS CoV-2 de los laboratorios Moderna y Pfizer/BioNTech.
- ➔ **Vectores víricos recombinantes:** consisten en un virus (adenovirus o virus influenza) modificado genéticamente incorporando genes que codifican el antígeno de interés, pero que no se replica, junto con promotores para maximizar la expresión. Los vectores se adhieren a la membrana celular eucariota e inyectan su ácido nucleico modificado en la célula. Como ejemplos relevantes se conocen las vacunas anti SARS CoV-2 del

laboratorio Astrazeneca y del Instituto Gamaleya que utilizan adenovirus no replicativos como vectores.

3.1.5. Vacunas terapéuticas

Una de los ámbitos de aplicación para este tipo de vacunas es el tratamiento del cáncer. Las mutaciones que provocan la división celular descontrolada también provoca cambios sutiles en la dotación antigénica de su superficie. Existen antígenos específicos relacionados a cada tipo de cáncer que pueden ser usados en la construcción de una vacuna. Una desventaja es que los lisados de tejido tumoral pueden incluir también antígenos propios, causando patologías autoinmunes. Un ejemplo es el Racotumomab, un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo de origen murino que actúa como inmunoestimulante (por eso se lo considera una vacuna terapéutica). Este anticuerpo monoclonal funciona como antígeno induciendo la producción de IgG e IgM específicos contra antígenos glicosilados (en particular el NeuGcGM3) presente específicamente en las células tumorales. Está indicado en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas recurrentes o con estadios avanzados cuando no responden a otras opciones. En su formulación contiene hidróxido de aluminio como adyuvante (ver apartado 3.4.2).

3.2. Producción de vacunas bacterianas

La producción de vacunas bacterianas comprende diferentes etapas que se detallan a continuación (Figura 67).

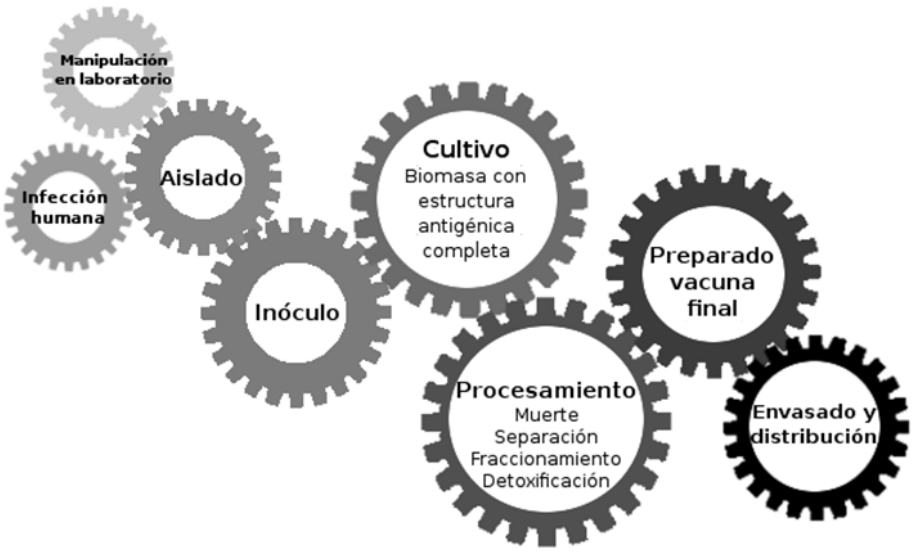


Figura 67. Producción de vacunas bacterianas. Nota. Imagen creada por Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3.2.1. Obtención del aislado y preparación del inóculo

Generalmente se parte de agentes patógenos aislados de infecciones humanas y/o veterinarias y se aíslan para disponer de un cultivo puro del microorganismo. Luego, 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 serán congeladas a -70 °C o liofilizadas para constituir un *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 diferentes lotes de la vacuna.

3.2.2. Cultivo

Las condiciones óptimas de cultivo son críticas para el crecimiento satisfactorio de la biomasa bacteriana necesaria con una estructura antigénica completa para la preparación de la vacuna. Se prefiere el empleo de grandes fermentadores utilizando medios de cultivo preferentemente de composición conocida 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 se inocula en un **medio de preproducción**. Pueden hacerse uno o más pasajes. Luego el desarrollo es utilizado para inocular el **medio de producción** (Figura 68). El crecimiento es controlado y regulado, debiendo monitorearse y ajustarse el pH y potencial redox durante el proceso. Finalmente, se recolectan los cultivos.

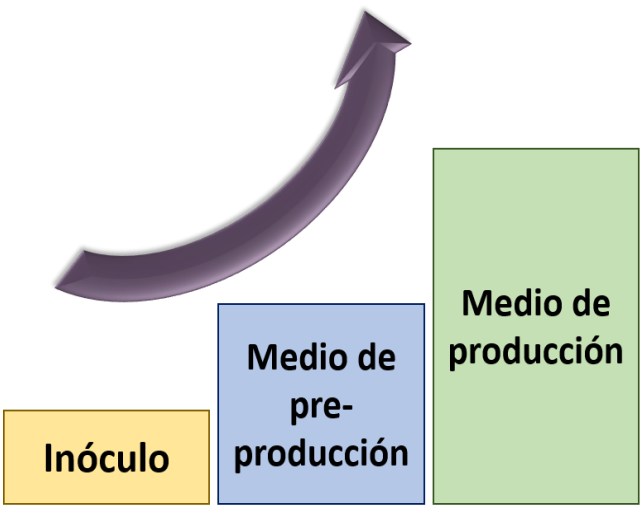


Figura 68. Etapas del cultivo de vacunas bacterianas. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino y Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3.2.3. Procesamiento

El caldo de cultivo obtenido es una mezcla de células bacterianas, productos metabólicos y medio agotado. Su procesamiento depende del tipo de vacuna.

- ➔ *Vacunas vivas atenuadas:* en este caso el caldo es inocuo y todo lo que se necesita efectuar es la separación de la biomasa (por centrifugación o precipitación celular)y la resuspensión en un diluyente adecuado seguido de liofilización (Figura 69a).
- ➔ *Vacunas muertas inactivadas:* el caldo es sumamente peligroso y debe inactivarse empleando métodos físicos (calor) y/o químicos (fenol, formaldehído, acetona). El proceso debe validarse asegurándose que los residuos sean el mínimo aceptado por la autoridad regulatoria, luego se separa la biomasa, se descarta el líquido y las células muertas son resuspendidas en una solución salina. Finalmente, si es necesario obtener algún componente celular (subunidad) se realiza el fraccionamiento y purificación mediante la extracción con solventes y otros procesos (Figura 69b).

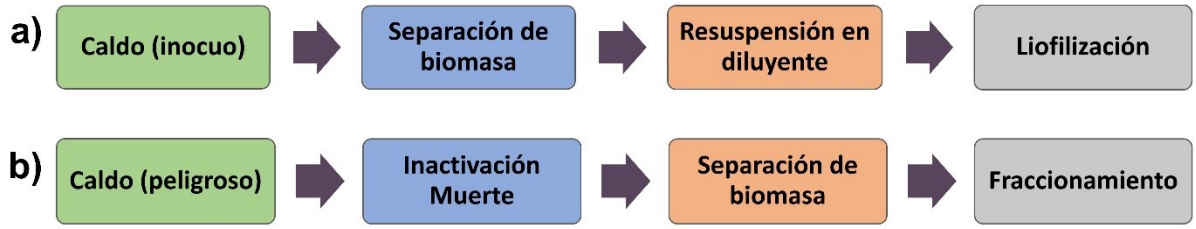


Figura 69. Etapas del procesamiento de vacunas **a)** vivas atenuadas, **b)** inactivadas. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino y Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

- ➔ *Toxoides (subunidades):* Las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani* son liberadas al caldo por lo que las células serán descartadas y el caldo peligroso que contiene las toxinas exocelulares debe ser sometidas a la detoxificación para obtener toxoides inofensivos. Este proceso se realiza por tratamiento con formaldehído. Finalmente, se realiza el fraccionamiento para la purificación del toxoide o la toxina dependiendo de si se realiza antes o después de la detoxificación (Figura 71).

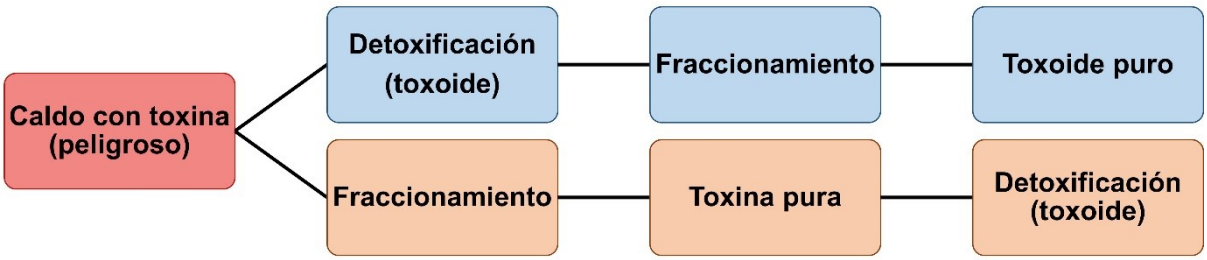


Figura 70. Etapas de obtención y purificación de toxoides. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino y Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3.3. Producción de vacunas virales

Debido a que los virus se replican en células vivas, las primeras vacunas virales se hicieron en **animales** (espina dorsal en conejos, cerebro de ratón, en algunos casos se sigue usando para producción de la vacuna antirrábica), aunque actualmente se utilizan **cultivos celulares**, excepto por las vacunas antigripales y contra fiebre amarilla que aún se obtienen en cultivos de embrión de pollo.

3.3.1. Replicación de los virus

Es primordial recordar que los virus para replicarse dependen de un huésped celular, así que para obtenerlos en grandes concentraciones podrán utilizarse:

- ➔ **Embrión de pollo:** es aún el huésped más conveniente para la replicación de los virus influenza y de la fiebre amarilla, el primero se acumula en el **líquido alantoideo** del huevo infectado, mientras que el segundo se acumula en los **tejidos nerviosos del embrión**.
- ➔ **Cultivos celulares:** se desarrollan como cultivos en monocapa en las paredes de recipientes de vidrio, perlas de vidrio o un sistema de placas múltiples. Generalmente se obtienen de riñón de mono, embriones de pollo, células diploides humanas (actualmente son los más utilizados).

3.3.2. Procesamiento del material viral

- ➔ **Embrión de pollo:**

1) *Vacuna antigripal:* se centrifuga el líquido alantoideo que contiene las partículas virales y se obtiene un sobrenadante rico en virus. Para **vacunas vivas atenuadas** el sobrenadante es convenientemente diluido. Para **vacunas inactivadas**, se trata con formol o beta-propiolactona. Para obtener antígenos de superficie como la **hemaglutinina** se trata la suspensión con éter (Figura 71).

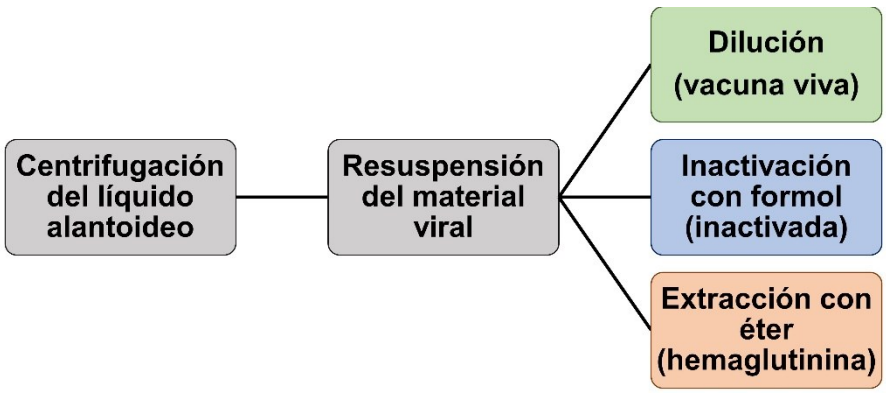


Figura 71. Etapas de obtención y purificación para obtención de las vacunas antigripales. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino y Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

2) *Vacuna contra la fiebre amarilla*: los embriones de pollo son homogeneizados en agua para obtener un puré que contiene el virus. Luego se centrifuga para precipitar el residuo del embrión quedando el virus en el sobrenadante acuoso (Figura 72).

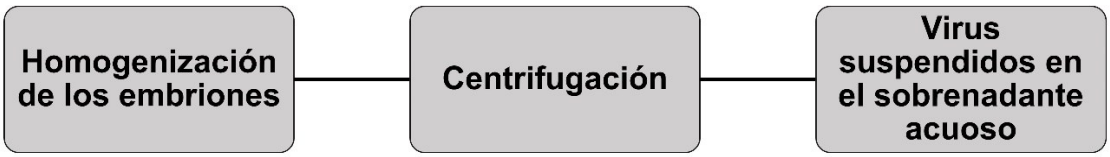


Figura 72. Etapas de obtención de virus contra la fiebre amarilla. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino y Mg. Verónica I. Gómez. Licencia CC-BY-SA 4.0.

➔ **Cultivos celulares:** los cultivos infectados contienen poco residuo y pueden ser satisfactoriamente clarificados por filtración. Posteriormente, si se requieren virus inactivos se tratan con formaldehído o beta-propiolactona como ocurre en el caso de la vacuna de poliomielitis inactivada y vacuna antirrábica. La preparación de estas vacunas inactivadas también incluye una etapa de concentración que puede realizarse mediante **adsorción** y **elución** del virus (poliomielitis) o **ultrafiltración** (antirrábica).

Las vacunas virales vivas atenuadas pierden potencia rápidamente en suspensión, para disminuir este problema son congeladas o se les agrega un agente estabilizador. Por ejemplo, la vacuna contra la poliomielitis viva atenuada, se estabiliza efectivamente con el agregado de $MgCl_2$ o sacarosa.

3.4. Preparado de la vacuna final (bacterianas y virales)

Los distintos componentes de la vacuna se mezclan asépticamente para obtener la vacuna final. Se realiza en un gran recipiente cerrado, provisto de agitación y de distintas entradas para la adición de cada ingrediente de la vacuna. Luego la mezcla final de la vacuna es fraccionada en volúmenes pequeños y envasada en ampollas de dosis única o multidosis, pudiendo distribuirse en estado líquido o sólido (liofilizado). Finalmente los viales se sellan (Figura 73).

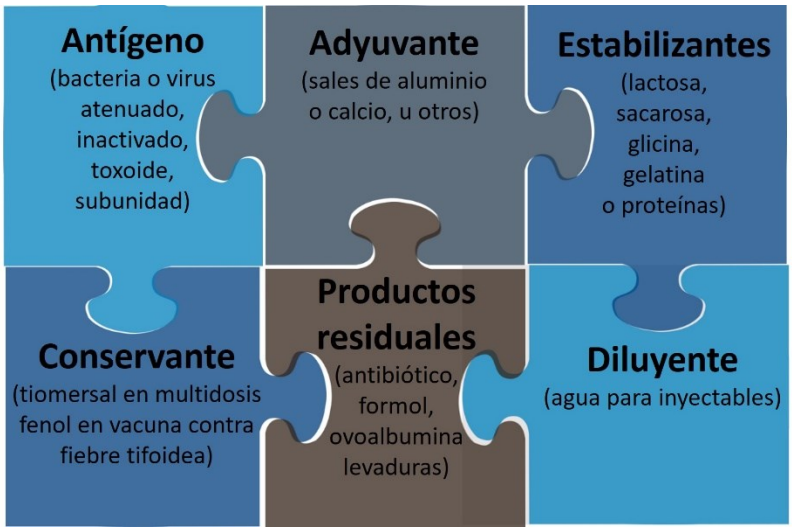


Figura 73. Componentes de la vacuna final. Nota. Imagen creada por Farm. Mariana E. Cozzolino. Licencia CC-BY-SA 4.0.

3.4.1. Antígeno y diluyente

Dependerá del tipo de vacuna y podrá ser el microorganismo entero atenuado o inactivado, subunidades, toxoides, polisacáridos solos o conjugados, partículas virus-like. Dichos antígenos se deben diluir a la concentración adecuada, siendo el más generalizado el agua esterilizada. Las vacunas bacterianas monovalentes usualmente requieren ser diluidas en gran extensión, para lo cual se utiliza un diluyente adecuado según la vacuna a preparar y según la concentración final requerida, asimismo el agregado de cada componente será determinado durante la fase de desarrollo. En cambio, en las vacunas virales, los fluidos del cultivo son utilizados generalmente sin diluir. Cuando se trata de vacuna polivalente o combinada se diluyen unos con otros.

3.4.2. Adyuvantes

Para mejorar la menor reactogenicidad y una inmunogenicidad disminuida se han desarrollado adyuvantes para una activación suficiente del sistema inmunológico. Aquellas vacunas que contienen adyuvantes se conocen como **ADSORBIDAS**, si no los contienen se denominan **SIMPLES**. El uso de adyuvantes en vacunas virales es limitado y su presencia es ventajosa solamente en vacunas hechas de virus inactivados.

Los adyuvantes que se emplean son:

- ➔ **Sales de aluminio:** proporcionan efectos proinflamatorios o inmunoestimuladores, y protegen al antígeno de una degradación rápida, su desventaja es estimular únicamente la respuesta humoral. Se usan el hidróxido o fosfato de aluminio. El fosfato de calcio se usa en algunos países como alternativa.
- ➔ **Emulsiones aceite en agua (O/W):** son ejemplos de este tipo de adyuvantes MF59TM (aceite escualeno, Tween 80 y Span-85) y ASO3 (escualeno, vitamina E y polisorbato

80). Ambos potencian la activación de células presentadoras de antígeno (APCs) y activan una fuerte respuesta humoral.

- ➔ **Liposomas:** actúan como vehículo del antígeno y promueven las respuestas humorales y celulares.
- ➔ **Ácidos nucleicos ADN y ARNm:** funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales representan "señales de peligro" conservadas que son reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), principalmente del sistema inmunológico innato.
- ➔ **3-O-desacil-4-monofosforil lípido A (MPL por sus siglas en inglés):** se extrae del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* R595. El sistema adyuvante 04 es una combinación de MPL adsorbido en hidróxido o fosfato de aluminio, mientras que el adyuvante denominado RC529 es un análogo sintético del MPL.

3.4.3. Conservantes

Son sustancias antimicrobianas que se adicionan a viales multidosis e impiden la contaminación microbiana que puede ocurrir al extraer cada dosis. cuando se abre un vial que se utilizará para vacunar a más de una persona. Usualmente, se usa como conservante el timerosal. Otro ejemplo, es el fenol que se utiliza específicamente en la vacuna contra la fiebre tifoidea. Sin embargo, no se incluyen conservantes en los productos liofilizados y en las preparaciones líquidas monodosis.

3.4.4. Estabilizantes

Son sustancias químicas que impiden que se produzcan reacciones químicas en la vacuna y evitan que los componentes de la vacuna se adhieran al vial. Puede emplearse azúcares (lactosa, sacarosa), aminoácidos (glicina), gelatina y proteínas.

3.4.5. Productos residuales

Corresponden a sustancias residuales que están presentes en cantidades ínfimas debido a que son utilizadas durante la fabricación. Si bien no son ingredientes activos en la vacuna final debe informarse que están presentes. Dichas sustancias variarán en función del proceso de fabricación utilizado, algunas de ellas son proteínas de huevo (ovoalbúmina), levaduras (vacunas recombinantes), antibióticos (generalmente aminoglucósidos como neomicina o gentamicina), formol (vacunas inactivadas y de toxoides).

3.5. Vacunas combinadas

Las vacunas monovalentes previenen una sola enfermedad, en cambio las **vacunas combinadas** inducen inmunidad a dos o más enfermedades simultáneamente y son tan

convenientes como usadas individualmente y se preparan mezclando componentes de diferente fabricación (inactivado, subunidad, recombinante). Ejemplos:

- ➔ **Doble bacteriana (DT/vac):** vacuna de subunidades conteniendo toxoide diftérico y tetánico.
- ➔ **Triple bacteriana (DPT/vac):** difteria- pertusis-tétanos compuesta por toxoide diftérico y tetánico y células enteras de *Bordetella pertussis*.
- ➔ **Cuádruple:** triple más diferentes serotipos de poliovirus inactivados.
- ➔ **Quíntuple:** cuádruple más polisacárido de *H. influenzae* tipo b (conjugada).
- ➔ **Séxtuple:** quíntuple más antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (recombinante).

3.6. Control de calidad

El control de calidad tiene dos objetivos básicos, probar tanto la eficacia **(potencia)** como la **seguridad** de cada producto, estos ensayos son requeridos durante la producción y en el lote final.

3.6.1. Test de identidad

Son ensayos inmunoquímicos para corroborar que el material corresponde a la leyenda del rótulo, corresponde a un análisis cualitativo. Se efectúa por métodos de **aglutinación** y **precipitación** “in vitro” en el caso de vacunas bacterianas y por **neutralización** de los efectos citopatogénicos usando antisueros específicos en el caso de vacunas virales atenuadas.

3.6.2. Ensayo de potencia

Son ensayos de cuantificación que dependen del tipo de vacuna.

1) *Métodos biológicos en animales*: se evalúa la capacidad antigénica de la vacuna para estimular la formación de **anticuerpos** en comparación con una vacuna “estándar”. 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 estándar 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.
2) *Métodos de recuento:* válido para determinar la concentración de bacterias o virus en vacunas vivas atenuadas. Se emplean métodos de recuento de colonias (bacterias) o calvas (virus). Ver trabajo práctico N° 6.
3) *Métodos inmunoquímicos:* similares a los ensayos de identidad, pero que permiten cuantificar la cantidad de antígeno.

3.6.3. Test de seguridad

Debido a que muchas vacunas son preparadas utilizando materiales de partida sumamente tóxicos, estos ensayos son de vital importancia. Se pueden describir los siguientes tipos principales:

1) *Ausencia de toxina e irreversibilidad del toxoide:* Este ensayo permite corroborar la inocuidad de toxoides diftérico y tetánico. Se realiza por inoculación en cobayos, los cuales son altamente sensibles.
2) *Ensayo de neurovirulencia*: Es específico de las vacunas virales atenuadas e inactivadas contra la poliomielitis (Sabin y Salk). Se procede a la inoculación intraespinal en monos para corroborar que la atenuación o inactivación fueron exitosas y que no haya posibilidad de reversión a un grado de virulencia capaz de producir enfermedad en el vacunado.
3) *Ensayo de esterilidad:* a excepción de la vacuna de la viruela hecha desde dermis y las vacunas vivas atenuadas como BCG, todas las vacunas deben ser estériles. El producto se filtra a través de membranas que luego se transfieren a caldos, se incuban 14 días y si se mantienen traslúcidos (ausencia de turbidez) el producto está estéril.
4) *Producto libre de toxicidad anormal:* para detectar contaminantes tóxicos, 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.
5) *Presencia de aluminio y calcio:* es específico para las vacunas adsorbidas. La cantidad de aluminio o calcio no debe superar los límites especificados por las farmacopeas y se determina mediante volumetría complexométrica.
6) *Concentración de formol libre:* se determina en vacunas inactivadas o de toxoides y se estima por espectrofotometría mediante una reacción de color con acetilacetona.
7) *Concentración de fenol:* no debe exceder 0,5 % cuando se usa como agente conservante en la vacuna tifoidea o vacuna del cólera.
8) *Concentración de ovoalbúmina:* es un ensayo específico para vacunas virales fabricadas en huevos (vacuna antigripal)

BIBLIOGRAFÍA

Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). *Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(2), 106-114.

Crommelin, D. J., Sindelar, R. D., y Meibohm, B. (Eds.). (2013). *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications* (4ª Ed.). New York, USA: Springer Science & Business Media.

Farmacopea Argentina. (2003). *Farmacopea Argentina* (7ª Ed., Vol. 3). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.

Farmacopea Europea (2010). *European Pharmacopoeia Commission, & European* (7a Ed., Vol. 1). Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. Council of Europe.

Foltz, I. N., Karow, M., & Wasserman, S. M. (2013). Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. *Circulation*, 127(22), 2222-2230.

Talesnik Guendelman, E. (2016). Uso clínico de inmunoglobulina. *ARS Médica Revista de Ciencias Médicas*. 23(3), 207-209.

Thomas, S. (Ed.). (2016). *Vaccine Design Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases*. New York, USA: Humana Press.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2017). *Introducción a la Microbiología* (12ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

Vashishtha, V. M., Kalra, A., y Thacker, N. (2015). *FAQS on vaccines and Immunization Practices* (2a Ed.). Jaypee Brothers Publishers.

Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., y Dewitte, H. (2019). Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*, 28, 100766.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

OBJETIVOS

1) Comprender los aspectos más fundamentales respecto de la metodología de producción de las distintas vacunas, inmunosueros y anticuerpos monoclonales, disponibles en el mercado.
2) Desarrollar habilidades profesionales transversales como trabajar colaborativamente, diseñar presentaciones y exponer conocimientos oralmente de manera clara y efectiva.

1. Modalidad del seminario

Se desarrollarán seminarios a partir de una monografía de la Farmacopea Argentina que proporcionan los docentes y de la consulta de otras fuentes adicionales que pueda seleccionar cada grupo. Se expondrán presencialmente en grupos, en un tiempo aproximado de 10 minutos por seminario. Los temas serán luego sorteados entre los grupos.

Los integrantes de cada grupo deberán realizar colaborativamente una investigación bibliográfica, siguiendo las sugerencias de los docentes. Con la información recabada diseñarán una presentación de Google, que será compartida por los docentes, Dicha presentación debe reflejar el trabajo colaborativo, de comprensión y síntesis de la lectura del

material bibliográfico investigado, y la vinculación con los contenidos teóricos correspondientes.

Es necesaria la lectura de los apartados generales de análisis (335, 336, 339, 415 y 745).

2. Estructura de la presentación de diapositivas

2.1. Seminarios sobre vacunas, inmunosueros o inmunoglobulinas:

a) Portada: deberá contener el título, fecha, número de grupo e integrantes.
b) Descripción del microorganismo, de la enfermedad prevenida y definición de la vacuna.
c) Etapas de producción del producto inmunológico.
d) Ensayos requeridos en el control de calidad, incluyendo la valoración.
e) Etiqueta y especificaciones que deben figurar en ella.
f) Formas comerciales disponibles en Argentina.

2.2. Seminario sobre anticuerpos monoclonales

a) Portada: deberá contener el título, fecha, número de grupo e integrantes.
b) Introducción. Estructura básica de una inmunoglobulina.
c) Origen de Ac monoclonal.
d) Producción de Ac monoclonal (Fases de elaboración).
e) Producción de Ac monoclonal (Fases de transformación).
f) Moléculas recombinantes derivadas de Ac monoclonales.

3. Evaluación

Se realizará en forma grupal, aplicando la rúbrica provista oportunamente. Finalizada la exposición se realizará un coloquio de preguntas. Ambas actividades deberán ser satisfactorias para aprobar el trabajo práctico.