

Tema 7.- Pruebas bioquímicas para cocos Gram (-) y bacilos Gram (+)

COCOS GRAM NEGATIVOS

En este grupo vamos a incluir géneros Neisserias, Moraxella y Acinetobacter, aunque estudiaremos el género Neisseria.

1.- Medios de Cultivo:

Son muy exigentes y requieren medios muy enriquecidos, que les proporcionen Hierro y AA.

Se emplean: Agar Chocolate.
Thayer-Martin.
TTU (Texas Tech University).
Fundamentalmente Thayer Martin.

Requieren para su desarrollo una humedad bastante alta y una tensión de CO₂ entre el 5 % y el 10 %, a 35 °C - 37 °C, por lo que se incubarán en condiciones microaerófilas (estufa de CO₂ o campana con una vela encendida que agota el oxígeno).

Son muy sensibles a la desecación, por lo que las muestras para el cultivo deben ser inoculadas de inmediato en medios adecuados, o en su defecto colocarlas en un medio de transporte: frasco Transgrow que es un medio de Thayer Martin modificado, en pico de flauta con atmósfera de CO₂ al 10 %, o bien usar el sistema JEMBEC en el que el medio viene en placas en vez de en tubos.

El medio más empleado para el cultivo es el Thayer Martin modificado, TMM, que es un Agar Chocolate que lleva adicionado Vancomicina, Colistina y Nistatina en lugar de Risticetina, y una concentración de Agar al 2 % en lugar del 1 % para reducir el efecto invasor del Proteus y se ha aumentado la Glucosa del 0,1 % al 0,25 % a fin de intensificar el desarrollo de Neisseria Gonorrhoeae y enriquecido con Isovitalex que contiene vitaminas y AA, purina y otros complementos.

2.- Identificación:

- Neisseria Gonorrhoeae → Gonococo.
- Neisseria Meningitidis → Meningococo.

Examen microscópico:

Aparecen como diplococos Gram (-), reniformes o en formas de guisantes o granos de café mirándose unos a otros.

Son inmóviles.

Pueden poseer cápsula o no.

Examen macroscópico:

Colonias blanco grisáceas, opacas y convexas en medio TMM tras 24-48 horas de incubación, en estufa a 35 -37 °C con 5 -10 % de CO₂.

Citocromo oxidasa (+).

Catalasa (+).

Los Acinetobacter y Moraxella son oxidasa (-).

3.- Pruebas Bioquímicas:

Prueba de fermentación de los Hidratos de Carbono:

Principio: se trata de observar la capacidad de fermentar ciertos azúcares como Glucosa, Maltosa, Lactosa y Sacarosa por parte de los m.o. tipo Neisseira.

Medios y reactivos:

1.- Se emplea el medio CTA (Cistina, Tripticasa Agar) debido a que se necesitan ausencia de extractos vegetales, de carne y azúcares, ya que los gonococos son muy sensibles a los Ácidos Grasos y otros elementos.

El CTA se somete a autoclave antes de añadir los Hidratos de Carbono, luego se añaden los diferentes azúcares a una concentración del 1 %, empleando soluciones de reserva que han sido esterilizadas previamente a través de un filtro Millipore. También pueden emplearse discos de papel impregnados en el azúcar correspondiente.

El indicador rojo fenol vira a amarillo a pH ácido.

Se distribuyen 2,7 ml del medio en tubos de 13 por 100 mm con tapa de rosca. Se conserva refrigerado hasta el momento de usar.

2- Soluciones de Hidratos de Carbono: Preparar con los diversos azúcares soluciones de reserva al 10 % y esterilizar por filtración. Distribuir pequeñas cantidades (de 1 a 2 ml) y conservarlos a -20 °C.

3.- Suspensión bacteriana: Inocular una placa de Agar Chocolate con el m.o. a investigar, incubar 18 a 24 horas, recoger todo el desarrollo en 0,5 ml de agua destilada.

Técnica

a.- Precalear tantos tubos de CTA como azúcares se deseen ensayar, normalmente cuatro (Glucosa, Maltosa, Lactosa y Sacarosa) y añadir 0,3 ml de las soluciones de azúcares a cada tubo o el disco de papel impregnado en el azúcar.

b.- Utilizando un hisopo o asa de platino inocular, sólo los 5 mm superiores del medio con la suspensión bacteriana, empleando hisopos o asas de platino distintos para cada tubo.

C.- Tapar herméticamente los tubos e incubarlos a 35 -37 °C (sin CO₂).

Interpretación y resultados

La aparición de una banda amarilla en la parte superior del medio indica producción de ácido y se interpreta como prueba positiva.

En el caso de emplear disco de papel, vira todo el medio a amarillo.

Las reacciones suelen ocurrir en 24 horas, sin embargo se debe dejar hasta 72 horas para dar resultado negativo.

	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa
Neisseria Gonorrhoeae	+	-	-	-
Neisseria Meningitidis	+	+	-	-
Neisseria Lactamicus	+	+	+	-

La especie *Lactamicus* es avirulenta.

No utilizar tubos mayores de 13 por 100 mm, ya que mayor superficie puede dar lugar a la aparición de falsos negativos.

Se debe utilizar un subcultivo de 24 horas y no un cultivo primario. Es importante no inocular más de 5 mm, y cerrar los tubos herméticamente y no incubar en CO₂.

Método Rápido según Brown

Reactivos

- 1.- Solución Sal Buffer (BSS).
Rojo Fenol al 1 %.
Agua destilada csp 100ml

La solución de Rojo Fenol al 1 % se prepara en agua destilada.

2.- Soluciones de Hidratos de Carbono: Se preparan soluciones de reserva de los Hidratos de Carbono al 20 % de los azúcares a ensayar

- 3.- Suspensión Bacteriana

Técnica

En tubos que contienen 0,1 ml de BSS, se añade una gota de cada una de las soluciones de azúcares a ensayar y una gota de suspensión bacteriana, incubar a 35 - 37 °C en estufa o baño María durante 4 horas.

Interpretación

La presencia de color amarillo indica acidificación del medio.

BACILOS GRAM POSITIVOS

Introducción

La mayoría de bacilos gram positivos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden formar parte de la microbiota normal tanto en el hombre como en animales. Frecuentemente no son patógenos primarios para el hombre, aunque hay algunas especies virulentas e importantes en patología humana.

Listeria

Cocobacilos, Gram positivos, que se presentan aislados o agrupados en cadenas cortas; móviles a 22°C mostrando un aspecto de "sombriilla", pero inmóviles a 37°C. Crecen bien sobre placas de agar sangre, produciendo colonias pequeñas, translúcidas, beta hemolíticas, similares a *Streptococcus sp*, pero el halo de hemólisis es pequeño en comparación con el tamaño de su colonia y a veces es necesario remover la colonia para visualizar la hemólisis. Se desarrollan a 30-37°C pero crece a bajas temperaturas (4°C), característica que le permite desarrollarse en alimentos refrigerados y producir infección por su consumo, convirtiéndose en el agente más importante por contaminación alimentaria. Son catalasa positiva y utilizan

hidratos de carbono, como la glucosa, manosa y ramnosa, pero no el manitol. Hidrolizan la esculina. Son aerobios facultativos y crecen mejor con una atmósfera de CO₂.

Erysipelothrix rhusiopathiae

Bacilos gram positivos, microaerófilos y exigentes. Carecen de la enzima catalasa negativos y producen H₂S. Son inmóviles y no sintetizan cápsula ni esporos. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; En humanos produce una celulitis "erisipeloides" caracterizada por una lesión eritematosa púrpura, dolorosa, no supurada y bastante pruriginosa. En general el proceso es autolimitado y rara vez causa enfermedad sistémica la enfermedad humana es poco frecuente y se limita a trabajadores de la pesca, de mataderos, carniceros, etc., configurando una enfermedad laboral. Presenta hialuronidasa y neuraminidasa como mecanismos de patogenicidad.

Corynebacterium

Bacilos Gram positivos pleomórficos, la mayoría de las veces en forma de mazo y agrupados en empalizada o formando letras en V, Y, L o caracteres chinos; por su morfología típica se conocen como difteroides. Son facultativos pero hay algunas especies aerobias estrictas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (suelo, agua, superficie de plantas) y forman parte de la microbiota normal de humanos y algunos animales.

Bacillus

Bacilos Gram positivos esporulados, largos, gruesos y delgados con bordes recortados y pueden agruparse en cadena; aerobios estrictos, con excepción de algunas especies facultativas. Se encuentran distribuidos en suelo, aguas y vegetales y que por sus esporas logran mantenerse muchos años, aún en condiciones adversas.

Objetivo

Identificar especies de los géneros ***Listeria*, *Erysipelothrix*, *Corynebacterium* y *Bacillus***.

Materiales

- Caldo BHI
- Agar Sangre
- Estufa de CO₂ o campana con una vela encendida que agota el oxígeno.

Procedimiento

1. Marcar adecuadamente cada uno de los medios.
 2. Sembrar la muestra en caldo BHI y agar sangre (por agotamiento).
 3. Incubar a 37°C por 24 horas en aerobiosis con atmósfera de CO₂.
 4. Realizar pruebas para la identificación del agente, según instrucción del profesor.
- (Motilidad, Glucosa, Manitol, etc)

Lectura e interpretación para la diferenciación e identificación del agente etiológico.

***Listeria*. Diagnóstico de Laboratorio**

Las colonias de listeria son medianas, cremosas, translúcidas, ligeramente convexas, de bordes regulares, rodeadas de una halo pequeño de beta hemólisis. Para iniciar la identificación además de las características macro y microscópicas de la colonia, se utiliza la prueba de la catalasa que permite diferenciarlos del género estreptococo.

Pruebas Bioquímicas

- Catalasa.

- Prueba de Motilidad

Determinar si la bacteria es móvil o inmóvil. Ayuda a diferenciar entre cepas de *Listeria monocytogenes* y cepas de *Corynebacterium*

Materiales

- Colonia aislada
- Agar para motilidad (semisólido)

Procedimiento

- Inocular en el medio de motilidad, haciendo una picadura central, hasta la mitad del medio
- Incubar a 22°C por 48 horas

Resultados

- Positiva: Motilidad en “sombriilla” .
- Negativa: Inmóvil, el medio permanece límpido (crecimiento únicamente en la línea de inóculo.

UTILIZACION DE HIDRATOS DE CARBONO

Principio

Determinar la capacidad del microorganismo de utilizar (fermentar o degradar) un carbohidrato específico incorporado en un medio de cultivo básico, con la producción de ácido, el cual provoca la disminución del pH en el medio y este se detecta mediante el viraje del indicador rojo de fenol a amarillo.

Materiales

- Cepa en estudio
- Caldo con un hidrato de carbono incorporado (Glucosa, Manosa, Sacarosa, Ramnosa, Manitol, etc.)

Procedimiento

- Sembrar la colonia en el caldo
- Incubar a 35°C por 24 horas

Resultados

- Positivo: cuando el indicador del medio vira a amarillo
- Negativo: cuando conserva su color rojo

Desarrollo

1. Describir las características macroscópicas de la colonia
2. Clasificar el tipo de hemólisis
3. Observar las características microscópicas mediante la coloración de Gram
4. Leer e interpretar las diferentes pruebas bioquímicas
5. Identificar el agente etiológico (Género y especie) del caso clínico asignado