



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MANUAL PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN
MICROBIANA DEL CEPARIO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO

P R E S E N T A:

Gildardo Herrera Quiroz

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. PATRICIA MILAN VIDAL

ASESOR DE TESIS

Q.F.B. PABLO JUÁREZ DE LOS SANTOS



CD. MX.

Agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi directora de tesis

Q.F.B. Patricia Vidal Millán, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por compartir cada uno de sus valiosos conocimientos, enseñanzas, sobre todo por enseñar siempre con el ejemplo

A mi asesor de tesis

Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos, por brindarme su amistad, paciencia, apoyo, pero sobre todo por cada uno de los consejos para realizar este proyecto, infinitas gracias

A mis sinodales

Mtra. Dora Alicia Pérez González, Q.F.B. Jesús Arroyo Rosales, Q.F.B. Ana Lilia Gutiérrez Romero por el tiempo que dedicaron a la revisión del presente trabajo.

Dedicatoria

A mi hija

Zyanya Yareni, por ser la parte más esencial en vida, por representar lo más bello de mi vida, por ser mi orgullo, mi más grande alegría, pero sobretodo por enseñarme a ser una mejor persona.

P.D. Papá siempre te amará

A mi esposa

Alejandra, por darme tu amor, pero sobre todo por la valentía de afrontar la vida a mi lado, por ser mi apoyo y mi compañera de lucha. Gracias por acompañarme durante el periodo universitario y por darme el mejor regalo de mi vida.

A mi mamá

Marilú, por ser la muestra más grande de ejemplo amor, cariño y honorabilidad, por cada uno de los valores y enseñanzas inculcadas, sin olvidar mencionar que eres la mujer más valiente del mundo.

A mi hermana

Zeltzin, por ser la mejor hermana del mundo



Tabla de contenido

Introducción:	iii
Marco teórico:	v
Manual:.....	v
Cepario.....	vi
Bacterias Gram Positivas.....	vi
Bacterias Gram Negativas.....	vii
Bacterias anaerobias.....	vii
UN MUNDO INVISIBLE.....	vii
Características generales de las enterobacterias.....	viii
<i>Escherichia coli</i>	viii
<i>Shigella flexneri</i>	ix
<i>Salmonella typhi</i>	ix
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	x
<i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i>	x
<i>Serratia marcescens</i>	x
<i>Serratia liquefaciens</i>	xi
<i>Proteus vulgaris</i>	xi
<i>Proteus mirabilis</i>	xi
Características generales de los bacilos no fermentadores.....	xii
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	xiii
Generalidades del género <i>Staphylococcus</i>.....	xiii
<i>Staphylococcus aureus</i>	xiv
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	xiv
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	xv
Generalidades del género <i>Streptococcus</i>.....	xv
<i>Streptococcus pyogenes</i>	xvi
<i>Streptococcus agalactiae</i>	xvii
<i>Streptococcus bovis</i>	xvii
<i>Enterococcus faecalis</i>	xviii
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	xviii
<i>Streptococcus viridans</i> características generales.....	xix
Grupo <i>mitis</i>	xix
Grupo <i>mutans</i>	xx
Características generales del género <i>Bacillus</i>.....	xx
<i>Bacillus anthracis</i>	xxi
<i>Bacillus cereus</i>	xxi
<i>Bacillus subtilis</i>	xxii



Características generales del género <i>Corynebacterium</i>	xxii
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	xxii
<i>Corynebacterium xerosis</i>	xxiii
Generalidades del género <i>Clostridium</i>	xxiv
<i>Clostridium septicum</i>	xxiv
<i>Clostridium sporogenes</i>	xxiv
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	xxvi
OBJETIVOS	xxvii
OBJETIVO GENERAL.....	xxvii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	xxvii
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	xxviii
RESULTADOS:.....	xxix
DISCUSIÓN.....	xxx
CONCLUSIÓN.....	xxxiv
REFERENCIAS.....	xxxvi



Introducción:

El laboratorio de producción microbiológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, es la fuente principal de insumos microbiológicos para las carreras de Medicina, Odontología, Biología y Química Farmacéutico Biológica así como para la Unidad Multidisciplinaria de investigación Experimental, el laboratorio es el encargado de proveer medios de cultivo, pruebas bioquímicas y cepas microbianas. Por ello este proyecto consiste en la elaboración de una Manual para la identificación, conservación y abastecimiento de cepas microbianas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Producción Microbiológica.

Los distintos géneros abordados en este manual serán los siguientes:

Enterococcus faecalis, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Rodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El manual incluirá la información básica necesaria cómo realizar el cultivo e identificación de dichas bacterias, incorporando información teórica, así como aspectos prácticos, fotografías que ejemplifiquen el proceso de identificación teniendo como propósito que las fotografías muestren el proceso práctico que se desarrolla.



La utilidad del manual es generar una herramienta bibliográfica, para que cualquier persona que tenga conocimientos básicos de microbiología, pueda aplicar o comprender como se lleva a cabo el proceso de identificación y conservación de cepas microbianas en el Laboratorio de Producción.



Marco teórico:

Manual:

Un manual es un documento administrativo que contiene de forma explícita, ordenada, y sistemática información sobre procedimientos que rigen un área determinada, la finalidad de un manual es generar instrucciones o acuerdos mínimos considerados necesarios, para la ejecución de un trabajo determinado.⁽¹⁾

El propósito de este manual es documentar de manera gráfica y teórica cómo se lleva a cabo el proceso de identificación de un microorganismo dentro del laboratorio de producción, de cómo se conservan las cepas microbianas con el objetivo de mantener sus características, con la finalidad de que cuando sean solicitadas por académicos de la Facultad las cepas tengan sus características específicas para que se puede realizar procesos de enseñanza e investigación con las cepas distribuidas por el laboratorio.

El manual documentará las distintas etapas en el proceso de identificación de un microorganismo empezando desde el aislamiento hasta la realización de pruebas particulares para cada especie, se dividirá en cuatro capítulos: identificación de bacilos Gramnegativos, identificación de bacilos Grampositivos, identificación de cocos Grampositivos, identificación de microorganismos fastidiosos, conservación de bacterias, conservación de hongos, mantenimiento del cepario y el servicio de distribución de las cepas microbianas.



Cepario

Es una colección ordenada y controlada de microorganismos, útil como una herramienta para el diagnóstico, investigación y desarrollo de nuevo conocimiento, la colección debe de conservarse intacta, manteniendo la mayoría de sus características, cada una de las cepas debe de estar perfectamente y correctamente identificada.⁽²⁾

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, el Laboratorio de Producción Microbiológica brinda el servicio del cepario para la enseñanza de los diferentes módulos de microbiología para las carreras de Medicina, Química Farmacéutico Biológica, Odontología y Biología, así como para algunos proyectos de investigación que se realizan dentro de esta institución. El cepario del Laboratorio de Producción Microbiológica cuenta con una colección que está diseñada para cubrir las necesidades de los diferentes módulos de microbiología de las distintas carreras.

El acervo del Laboratorio de producción Microbiológico es el siguiente:

Bacterias Gram Positivas

Enterococcus faecalis, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Micrococcus lysodeikticus*.



Bacterias Gram Negativas

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacterias anaerobias

Clostridium septicum, *Clostridium sporogenes*

UN MUNDO INVISIBLE

Los microorganismos son seres vivos que tienen un tamaño muy pequeño, tanto que el ser humano es incapaz de observarlos de manera directa, es decir no se pueden ver a simple vista, por lo tanto, todos los seres humanos tenemos la necesidad de observarlos a través de un instrumento llamado microscopio. El término microorganismo es amplio tanto que puede incluir diferentes grupos como los son: bacterias, hongos (mohos y levaduras), protozoos y algas microscópicas. Una de sus mayores características es que desarrollan un papel importante en el planeta, sin la ayuda de los microorganismos muchos procesos o reacciones no se podrían llevar a cabo. Otro de los factores importantes es la relación positiva entre seres humanos y microorganismos, la relación termina siendo benéfica para el ser humano, un ejemplo claro es la aplicación comercial de los microorganismos para la síntesis de muchos fármacos, enzimas, productos químicos. Pero algunas veces esta relación no es del todo benéfica en el peor de los casos la relación ser humano-microorganismos es dañina, un claro ejemplo es cuando un determinado microorganismo causa una enfermedad, hoy en día sabemos que ciertos microorganismos son causantes de enfermedades específicas.⁽³⁾



Características generales de las enterobacterias

Los bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en las muestras clínicas. Ampliamente dispersos en la naturaleza, estos microorganismos se encuentran en la tierra y el agua, sobre las plantas y como lo indica su nombre de la familia, en el tubo digestivo seres humanos y de animales.

Los miembros de *Enterobacteriaceae* pueden estar implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperarse de cualquier muestra recibida en laboratorio de microbiología médica. Hay ejemplos claros bien definidos, por ejemplo, los síndromes diarreicos y disentéricos, acompañados de fiebre y septicemia en los casos claros de fiebre tifoidea, eran provocados por especies de *Salmonella* y *Shigella*. En otro caso evidente la mayoría de los casos de neumonía, causados por la producción de esputo rojo ladrillo son causados por *Klebsiella pneumoniae*, otro de los ejemplos claros son protagonizados por *Escherichia coli*, diversas especies de *Proteus* y distintos miembros del grupo de *Klebsiella-Enterobacter* son aislados en la mayoría de las heridas traumáticas contaminadas con tierra o material vegetal, cualquier bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* se pueden diferenciar de los otros grupos de bacterias por tres pruebas bioquímicas características, todas las especies pertenecientes a esta familia fermentan la **glucosa, reducen los nitratos a nitritos y dan reacción citocromoxidasa negativo**.^(4,5)

Escherichia coli

Es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. Es el principal microorganismo asociado a sepsis por gramnegativos y shock inducido por endotoxinas. Es un importante patógeno que produce infección en vías urinarias, heridas, neumonías



en pacientes hospitalizados y meningitis en recién nacidos, esta especie se caracteriza por fermentar la lactosa y produce indol a partir de triptófano.^(6,7)

Shigella flexneri

La shigelosis es la diarrea más contagiosa de origen bacteriana, los seres humanos sirven como huésped natural, la enfermedad es transmitida vía fecal-oral y solo se requiere de 200 bacilos viables para producir la enfermedad, el género *Shigella* es uno de los géneros más fáciles de reconocer por el motivo que es bioquímicamente inerte, es decir la mayoría de las pruebas bioquímicas son negativas, se caracteriza solo por fermentar la glucosa en el caso de *Shigella flexneri* fermenta el manitol pero es difícil de distinguirlo ya que hay otros dos serotipos que dan el mismo patrón bioquímico y solo por serología se pueden distinguir.^(5,7)

Salmonella typhi

La género *Salmonella* es un grupo de microorganismos que se clasifica en diferentes serotipos, la única especie que se puede diferenciar por sus características bioquímicas es *Salmonella typhi*, la salmonelosis es una enfermedad entérica bacteriana importante para los seres humanos y algunos animales. La gran mayoría de casos de salmonelosis son causados por la ingestión de alimentos contaminados, causa enfermedades intestinales, pero también es un importante patógeno de infecciones extraintestinales, cabe señalar que *Salmonella typhi* es bioquímicamente menos activa que la mayoría de los serotipos y dan reacciones negativas a las siguientes pruebas: citrato de Simmons, ornitina descarboxilasa, la producción de gas es menor o nula cuando se fermenta la glucosa, fermentación del dulcitol, arabinosa, ramnosa.^(4,5,7)



Klebsiella pneumoniae

Esta bacteria es recuperada frecuentemente de muestras clínicas con pacientes con neumonía, también es capaz de causar otras infecciones como lo son septicemia, meningitis (en pacientes recién nacidos) e infecciones de las vías urinarias. Este género tiene como característica que las colonias que crecen en distintos medios de cultivo son muy mucoides, fermentan la lactosa y se puede distinguir de las otras tribus de la familia *Enterobacteriaceae* por dar reacción positiva de Voges-Proskauer y ser inmóviles.^(7,8)

Enterobacter cloacae y *Enterobacter aerogenes*

Son las dos especies más recuperadas de este género, son causantes de infecciones en las vías urinarias y respiratorias, heridas quirúrgicas o bacteremias, es uno de los patógenos que representa mayor peligro para los pacientes inmunocomprometidos, este género se caracteriza por fermentar la lactosa, es productor de acetoina por lo tanto da la reacción Voges-Proskauer positiva, es muy fácil diferenciar estas dos especies a través de la reacciones de ornitina y lisina descarboxilasa junto con arginina dehidrolasa.^(5,7)

Serratia marcescens

Es la especie más importante de este género y a menudo se asocia con distintas infecciones humanas principalmente con neumonía y septicemia entre pacientes que desarrollan en él procesos malignos o que estén recibiendo algún tratamiento de un agente quimioterápico, esta especie se caracteriza por no fermentar la lactosa, es voges proskauer positivo, produce una endonucleasa extracelular que puede identificarse por la prueba DNasa, y se puede diferenciar de las otras especies de *Serratia* por que no fermenta la arabinosa es resistente de manera natural a colistina y cefalotina.^(4,7)



Serratia liquefaciens

Es un complejo que tiene varios grupos de hibridación de DNA, se ha comprobado que produce brotes de infección en lugares donde la higiene es deficiente y las principales patologías a las que está asociado es a infecciones de tracto urinario y respiratorio, se ha aislado en el torrente sanguíneo, en casos de sepsis, meningitis y neumonía, se presenta en su mayoría en paciente pediátricos, se caracteriza por ser positivo para la reacción Voges-Proskauer, DNasa y su puede diferenciar de *Serratia marcescens* porque es capaz de fermentar la arabinosa. .(4,7)

Proteus vulgaris

La mayoría de los aislamientos se recuperan de pacientes inmunocomprometidos, por lo común de pacientes que recibieron regímenes de antibióticos prolongados, está asociado a infecciones el tracto urinario y respiratorio principalmente, se puede identificar de manera fácil esta especie de microorganismo ya que da positivo la reacción de fenilalanina desaminasa, es capaz de hidrolizar la urea y es positivo en la pruebas de esculina y DNasa pero sobre todo hay un fenómeno que se presenta en medio sólido llamado swarming que es característico de este género.(7,9)

Proteus mirabilis

Es la especie de este género aislada con mayor frecuencia en los seres humanos y es el agente causal tanto de infecciones del tracto urinario, así como de heridas, se puede diferenciar de *Proteus vulgaris* porque son cepas indol negativas, producen swarming y dan positivo para la reacción de ornitina descarboxilasa y son salicilina negativa.(7,9)



Características generales de los bacilos no fermentadores

Los bacilos gramnegativos no fermentadores constituyen un grupo de bacilos no esporulados aerobios que no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía, la energía obtenida a través de otras vías metabólicas distintas a las reacciones de fermentación, los géneros y especies de bacilos gramnegativos aerobios que componen este grupo muestran un crecimiento abundante dentro de las 24 horas sobre la superficie de agar hierro de Kingler (KIA) y agar triple azúcar (TSI), no tienen la capacidad de acidificar el medio pero si de basificarlo, algunos de los géneros importantes de este grupo son *Achromobacter*, *Acinobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*.

Los bacilos gramnegativos no fermentadores oxidan los carbohidratos en lugar de fermentarlos, ocupan la vía Entner-Doudoroff (cataboliza de glucosa a piruvato), ésta vía tiene como mayor característica formar ácido glucorónico y sus derivados y se apoya del ciclo de Krebs para generar ácido cítrico y sus derivados, con la formación abundante de agua, por lo tanto los productos generados por esta vía son menos ácidos que los formados por otros grupos como son las enterobacterias, por lo tanto no se puede diferenciar las especies por medio de las reacciones de fermentación clásicas por medio de caldo rojo de fenol, sino que necesita sistemas mucho más sensibles para detectar los productos de esta vía metabólica.⁽⁵⁾

Se puede sospechar que una cepa aislada es un bacilo no fermentador por la falta de fermentación de glucosa y lactosa en agar TSI, la reacción citocromo oxidasa es positiva y algunas cepas no pueden crecer en agar MacConkey, la prueba para verificar la utilización de glucosa es la prueba de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson, la identificación definitiva se da por medio de una serie de pruebas como son la producción de pigmento, motilidad, hidrólisis de urea, reducción de nitratos, producción de indol, descarboxilación y hidrólisis de esculina.^(4,5,10)



Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo gramnegativo que crece bien en agar Sangre y MacConkey las colonias son de color gris en agar sangre, en la periferia muestran una expansión, pueden ser muy mucosas, con un brillo metálico parecidas a escamas de caimán, la diferencia más evidente entre las demás bacterias es que *Pseudomonas aeruginosa* produce un pigmento hidrosoluble de color azul, verde o de color café, aunque puede haber algunas cepas que no lo produzcan. Las colonias despiden un olor característico a uvas o a tortilla mojada.(5,7)

Pseudomonas aeruginosa es el bacilo no fermentador aislado con mayor frecuencia a nivel clínico y se encuentra con mayor prevalencia en pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, en pacientes con trasplante de órganos o adictos a droga intravenosas, las infecciones están asociadas a lugares anatómicos con acumulación de humedad, es común a nivel nosocomial encontrarlo en infecciones del tracto urinario y respiratorio la mayoría siendo mortales, su aislamiento e identificación es fácil, es un bacilo gramnegativo, oxidasa positivo, con presencia de pioverdina, crecimiento a 42 °C, son sensibles a la polimixina B.(4,7)

Generalidades del género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está compuesto por varias especies, muchas de ellas son aisladas de muestras clínicas humanas, son bacterias grampositivas que tienen forma de cocos pueden estar agrupados en pares, tetradas o cadenas pero normalmente se encuentran en forma de racimo de uvas, son inmóviles, no formadores de esporas y catalasa positivos, los seres humanos pueden estar colonizados o infectados, las especies más importantes son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.(11)



Staphylococcus aureus

Es el patógeno más importante dentro el género *Staphylococcus*, se encuentra en el ambiente externo, y coloniza las narinas aproximadamente del 20-40% de los adultos, forman parte de la microflora normal del ser humano, puede causar infecciones oportunistas en los seres humanos dentro de las infecciones más importantes son las cutáneas, protuberancias llenas de pus, es una fuente común en las infecciones de heridas posquirúrgicas, de casos graves de neumonía, bacteriemia, endocarditis, osteomielitis y meningitis. Además algunas cepas pueden ocasionar intoxicación alimentaria, shock tóxico o puede producir síndrome estafilocócico de la piel escaldada. La identificación de esta especie se realiza muy fácilmente, es un organismo catalasa y coagulasa positiva además fermenta el manitol y produce una endonucleasa termoestable.^(5,11)

Staphylococcus epidermidis

Cuando en la mayoría de los hallazgos clínicos son correlacionados con el hallazgo de *Staphylococcus coagulasa negativos*, *S. epidermidis* por mucho es el organismo aislado con mayor frecuencia y se encuentra entre un 50 hasta un 80% de los aislamientos. Gran parte de las infecciones relacionadas con *S. epidermidis* son adquiridas en hospitales con excepción en algunas de ellas como es el caso de endocarditis de válvula nativa y prótesis valvular. Las principales infecciones de las cuales ha sido aislado y documentado *S. epidermidis* son del tracto urinario, heridas quirúrgicas, infecciones de varios dispositivos de prótesis, líquido cefalorraquídeo, la identificación de *Staphylococcus epidermidis* se puede realizar de manera certera ya que es coagulasa negativo y no es capaz de fermentar tanto el manitol como la trehalosa.⁽⁵⁾



Micrococcus lysodeikticus

Es un coco grampositivo, es no móvil que se puede encontrar en el medio ambiente en el suelo, el polvo, el agua, el aire o como flora normal en la piel de los mamíferos, se considera como un contaminante si proviene de una muestra clínica, se puede diferenciar de manera muy fácil por la producción de un pigmento de color amarillo, además de ser catalasa y ureasa positivos y su agrupación a nivel microscópico es en tétradas. (4,5)

Generalidades del género *Streptococcus*

Los *Streptococcus* y *Enterococcus* son bacterias grampositivas en forma de cocos que comparten muchas de sus características, son microorganismos catalasa negativas, que crecen en pares en medio sólido o en forma de cadena en medios líquidos, son anaerobios facultativos, aunque algunas de sus especies mejoran su crecimiento en condiciones anaerobias y la mayoría se puede estimular su crecimiento con el aumento de la concentración de CO₂. Son organismos homofermentadores, es decir que el único producto obtenido por la fermentación de la glucosa es el ácido láctico, los estreptococos son clasificados desde el punto de vista serológico teniendo en cuenta los antígenos que componen la superficie celular, estos antígenos están constituidos principalmente por hidratos de carbono, se pueden diferenciar fácilmente del género *Staphylococcus sp.* por la prueba de catalasa, para el género *Streptococcus* es negativa.



Grupo	Especie	Hemólisis
Lancefield		
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Beta</i>
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Beta</i>
C	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus equi</i>	<i>Beta</i>
D	<i>Enterococcus</i> sp., <i>Streptococcus bovis</i> (<i>S.equinos</i> , <i>S.galloyticus</i> , <i>S.pasterurianus</i> , <i>S. infantarius</i>)	> <i>beta</i> , <i>alfa</i>
F	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> .	<i>Beta</i>
G	<i>S. canis</i>	<i>Beta</i>
No clasificado	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Alfa</i>

La pionera en el ámbito de clasificación de los estreptococos es Rebecca Lancefield, clasificó los estreptococos en seis grupos A, B, C, D, F y G de acuerdo al polisacárido del cual está compuesta su pared celular, todos los estreptococos que pertenecen a esta clasificación producen β -hemólisis en agar sangre de carnero al 5%.^(4,5)

Streptococcus pyogenes

Los seres humanos representan el principal reservorio natural de los estreptococcus β -hemolíticos, estos microorganismos son transmitidos de persona a persona por vía respiratoria, la infección más frecuente causada por *Streptococcus pyogenes* es la faringitis estreptocócica, tiene predilección por pacientes en edad escolar y en personas de la tercera edad, el período de incubación es de dos a cuatro días, otras infecciones provocadas por esta especie son el impétigo, la sepsis puerperal, erisipela, además de estar asociado a afecciones autoinmunes como la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis aguda. La identificación de *Streptococcus*



pyogenes es muy sencilla, la cepa debe de ser β - hemolítica, sensible a bacitracina y resistente a Trimetoprim-Sulfametoxazol, es importante mencionar que no es necesario realizar pruebas de susceptibilidad a esta especie ya que se ha mantenido sensible a penicilina desde su introducción.⁽¹⁰⁾

Streptococcus agalactiae

Los estreptococos β -hemolíticos que constituyen el grupo B de la clasificación de Lancefield constituyen una causa importante de enfermedades en los periodos neonatales y perinatal, esta especie es asociada a la infección del recién nacido, tendiendo dos variantes la enfermedad de inicio temprano y tardío, la población que es propensa y se debe monitorear por su mayor riesgo son las mujeres embarazadas que estén en un periodo de 35-37 semanas de gestación, para evitar que se genere la transmisión vertical de madre a recién nacido. La identificación es muy sencilla las cepas de *Streptococcus agalactiae* es resistente a bacitracina y la prueba de CAMP es positiva.⁽⁴⁾

Streptococcus bovis

Pertenece al grupo D de la clasificación de Lancefield esta especie comúnmente se encuentra como flora intestinal de los vertebrados, puede causar bacteriemia, meningitis y endocarditis de válvula nativa y de válvula protésica, produce β -hemólisis aunque hay cepas que pueden producir hemólisis alfa o no tienen la capacidad de producir hemólisis en agar sangre de carnero al 5%, hidroliza la esculina en presencia de bilis y se diferencia del género *Enterococcus* porque no tiene la capacidad de crecer a una concentración de 6.5% de cloruro de sodio.^(5,12)



Enterococcus faecalis

Se clasifica dentro del grupo D de Lancefield, esta especie no pertenece al género *Streptococcus*, pero comparte la mayoría de las características, la diferencia más evidente es que los enterococos presentan principalmente son alfa hemolíticos o son cepas no hemolíticas cuando crecen en agar sangre de cordero, pero hay un pequeño número de cepas que pueden llegar a producir β -hemólisis, son catalasa negativo o puede llegar a dar la reacción muy débilmente positiva, crecen bien en presencia de altas concentraciones de bilis e hidrolizan la esculina, tienen la capacidad de crecer a grandes concentraciones de sal, descarboxilan la arginina, fermentan el sorbitol y manitol, pero no tienen la capacidad de fermentar la arabinosa, se puede diferenciar este género por el crecimiento en NaCl a una concentración de 6.5%. (5,7)

Es la especie aislada con mayor frecuencia a nivel clínico, se puede encontrar como patógeno en la mayoría de los sistemas, es causante de infecciones urinarias, intraabdominales, pélvicas, infecciones de heridas, tejidos blandos, sepsis neonatal y se ha reportado casos de meningitis, es uno de los géneros más difícil de tratar ya que posee una fuerte resistencia intrínseca a muchos medicamentos actualmente disponibles, inclusive hay cepas resistentes a vancomicina.(4)

Streptococcus pneumoniae

Es casi exclusivamente un patógeno en humano, los grupos que tienen una mayor vulnerabilidad son niños, ancianos y persona inmunocomprometidos, son causantes de infecciones como neumonía, sinusitis, peritonitis, son las tres infecciones principales que causan, pero tienen la capacidad de causar procesos invasivos severos como son la meningitis y sepsis.



Su estructura capsular está asociada a una mayor virulencia, se reconocen hasta el día de hoy 92 serotipos distintos, la cápsula está formada por polisacáridos y tienen como principal propósito evadir la fagocitosis, la identificación de *Streptococcus pneumoniae* es muy sencilla ya que las cepas son sensibles a la optoquina, otra de las pruebas que se puede ocupar cuando la prueba de optoquina no es concluyente es la de solubilidad en bilis.⁽¹⁰⁾

Streptococcus viridans características generales

El Grupo *viridans* incluye varias especies de estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos, los cuales constituyen parte de la flora normal de las vías respiratorias altas y del aparato urogenital, son los causantes de cerca del 30-40% de los casos de endocarditis de origen bacteriano. Se caracterizan por ser resistentes a la optoquina. El grupo *viridans* se compone por seis grupos principalmente, pueden ser diferenciados por seis pruebas bioquímicas que son arginina dehidrolasa, hidrólisis de esculina, producción de acetina, fermentación tanto de manitol como de sorbitol y la prueba de ureasa.^(5,13)

Grupo *mitis*

Grupo *mitis* se encuentran la cavidad bucal *S. mitis* es una de las especies aisladas con mayor frecuencia e los hemocultivos y tienen importancia clínica debido al aumento a su resistencia a la penicilina y otros β -lactámicos, es importante mencionar que este grupo es negativo para las seis pruebas antes mencionadas.

^(7,12)



Grupo *mutans*

Grupo *mutans* incluye estreptococos bucales que pueden ser encontrados en humanos y distintas especies animales es uno de los organismos asociados a padecimientos bucales, principalmente a la formación de caries que se desarrollan en el esmalte dental, se puede diferenciar de manera fácil ya que da positivo para la fermentación de manitol y sorbitol, produce acetoina e hidroliza la esculina, la reacciones de ureasa y arginina dehidrolasa son negativas, *Streptococcus mutans* tiene la capacidad de producir enzimas denominadas glucosiltransferasas, esta enzima es capaz de hidrolizar la sacarosa, conectando las glucosas para formar glucanos insolubles, estos glucanos son los que le permiten a este grupo de microorganismo adherirse a la superficie de la placa dental, este fenómeno es muy fácil de observar haciendo crecer esta especie en agar mitis-salivarius, las colonias se adhieren fuertemente al agar incluso se dificulta el tomarlas con el asa bacteriológica.^(12,14)

Características generales del género *Bacillus*

El género *Bacillus* está formado por un grupo grande de bacilos grampositivos facultativos y se caracterizan porque tienen la capacidad de formar endoesporas en condiciones aerobias, a nivel genético tienen un alto contenido de Guanina y Citosina, se puede diferenciar las distintas especies por la formación de ácido a partir de distintos carbohidratos, este género tiene una gran importancia a nivel industrial, muchas especies son utilizadas para la elaboración y producción de antibióticos, así como vitaminas, son utilizados como indicadores en procesos que miden la eficiencia de desinfectantes y esterilización.⁽⁹⁾



Bacillus anthracis

El carbunco es la enfermedad clásica causada por *B. anthracis*, se presenta fundamentalmente en animales herbívoros, los seres humanos pueden llegar a estar infectados cuando tienen contacto con animales y productos de origen animal que se encuentran infectados, el carbunco tiene tres formas clínicas que se presenta en el ser humano, el más peligroso es el carbunco respiratorio tiene una mortalidad entre 80-90% de todos los casos, las otras dos formas de carbunco son el cutáneo o gastrointestinal, de las tres formas el que se presenta con una frecuencia entre el 98-99%, el diagnóstico de *Bacillus anthracis* es de suma importancia al estar clasificado como un agente bioterrorista, bioquímicamente es muy fácil diferenciarlo ya que produce ácidos a partir de trehalosa, es importante mencionar que algunas cepas producen toxinas por la diferente combinación de tres proteínas distinta. (4,5,7)

Bacillus cereus

Al igual que otras cepas de *Bacillus*, en particular *Bacillus cereus* se puede encontrar con frecuencia en el aire, la paja y el arroz, esta cepa es similar genéticamente *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*, la diferencia entre cada especie son los plásmidos que dan origen a cada una de las toxinas que codifica cada una de estas especies, *B. cereus* produce mayormente gastroenteritis y es provocada por la codificación de exotoxinas, como la enfermedad no es comunicable en todos los países, no se pueden obtener cifras exactas los alimentos que se encuentran contaminados son el arroz y los productos de origen lácteo. Se puede diferenciar con mucha facilidad ya que produce ácido a partir de inulina, glicerol, salicilina y trehalosa.(5)



Bacillus subtilis

Es conocido como bacilo del heno o de la hierba, se encuentra principalmente en el suelo y en el tracto gastrointestinal de los rumiantes y seres vivos es la bacteria grampositiva más estudiada y es el organismo modelo para estudiar replicación cromosómica bacteriana y diferenciación celular y la utilidad en diferentes procesos biotecnológico se utilizan como convertidores de compuestos explosivos a compuestos inocuos, se utiliza para obtención de diferentes tipos de enzimas a través de procesos fermentativos ya que producen alrededor de 20 a 25 gramos por litro, las principales enzimas producidas son las proteasas y amilasas, produce ácidos a partir de glicerol, inulina, manitol salicilina, trehalosa, se han reportado muy pocos casos donde *Bacillus subtilis* participa como patógeno humano.⁽⁵⁾

Características generales del género *Corynebacterium*

El género *Corynebacterium* está compuesto por muchas especies, que incluyen como patógeno clásico a *Corynebacterium diphtheriae* el cual es el agente causal de la difteria. La gran mayoría de las especies que conforman al género *Corynebacterium* forman parte de la flora normal de la piel, así como las vías respiratorias altas, son bacillos pleomorfos, son catalasa positivos, inmóviles, no forman esporas y tampoco son ácido alcohol resistente. ⁽⁹⁾

Corynebacterium diphtheriae

Es el prototipo clásico del microorganismo toxigénico, la virulencia está relacionada casi por completo con la producción de su toxina diftérica. La difteria se transmite entre los seres humanos sobre todo por contacto directo, el estornudo o la tos. Se



ha comprobado que la portación sobre la piel o la portación en pacientes asintomáticos son fuentes frecuentes de contagio, el microorganismo se multiplica localmente en la nasofaringe posterior y la orofaringe, cuando la multiplicación es muy alta hay una acumulación de microorganismos, fibrina y células inflamatorias que generan la formación de una pseudomembrana, la formación de esta membrana puede llevar a la obstrucción de las vías aéreas.⁽⁵⁾

La mayoría de las muertes producidas por la difteria están directamente relacionadas con la acción que desempeña la toxina vía sistémica, se comprobó que la toxina tiene efectos directos sobre el corazón, el sistema nervioso central y periférico, el hígado y los riñones, aunque la difteria ha sido prácticamente erradicada en los países desarrollados por medio de la inmunización, en los países en vías de desarrollo sigue presentándose de manera recurrente.

Corynebacterium diphtheriae presenta cuatro biotipos diferentes de colonias distintas *gravis*, *mitis*, *intermedius* y *belfanti* difieren significativamente en la tinción de Gram, algunas reacciones bioquímicas y la gravedad del proceso patológico es distinto en los cuatro biotipos, tienen una singularidad que son bacilos grampositivos pleomorfos con una forma de porra o maza, son catalasa positivos, inmóviles, tienen una tendencia a formar disposiciones en forma de cerca o letras chinas sobre los extendidos teñidos con Gram, los biotipos de *Corynebacterium diphtheriae* reducen los nitratos (excepto el biotipo *belfanti* y puede ser identificado por esta prueba), el biotipo *intermedius* requiere lípidos para mejorar su crecimiento y el biotipo *gravis* produce ácido a partir de glucógeno y además todos los biotipos fermentan la glucosa y maltosa.⁽⁴⁾

Corynebacterium xerosis

Últimamente ha cobrado relevancia a nivel clínico ya que se ha asociado como patógeno principalmente en pacientes inmunocomprometidos, en infecciones como neumonía, osteomielitis y mediastinitis, se creía que era la especie más abundante



que se encontraba sobre la piel del ser humano, pero estudios genéticos demostró que la gran mayoría de los aislamientos clasificados como *Corynebacterium xerosis* son en realidad *Corynebacterium amycolatum*. Se puede diferenciar fácilmente porque tiene la capacidad de fermentar la glucosa, maltosa y la sacarosa.⁽⁵⁾

Generalidades del género *Clostridium*

Los bacilos grampositivos anaerobios formadores de esporas encontrados en muestras humanas son miembros del género *Clostridium*, la mayoría de las cepas encontradas a nivel clínico varían con respecto a su relación con el oxígeno y sus actividades fisiológicas catabólicas y anabólicas, la concentración de CO₂, debe de ser entre el 5- 10 %.^(4,5,7)

Clostridium septicum

Forma parte de los clostridios que con mayor frecuencia están implicados en la gangrena gaseosa, la gangrena es la instalación rápida de necrosis acompañada de licuefacción del músculo, formación de gas y con signos claros de toxicidad, se puede diferenciar con facilidad porque es capaz de fermentar la glucosa, pero no el manitol, lactosa y ramnosa, producen DNasa ^(5,7)

Clostridium sporogenes

Se encuentra como parte la flora normal dentro del sistema gastrointestinal, es importante a nivel fisiológico usa el triptófano para sintetizar indol, para posteriormente producir ácido 3-indolepropiónico, que es un tipo de auxina (hormona de las plantas) y actúa como potente antioxidante en el cuerpo y en el cerebro del ser humano además esta especie de clostridio se puede diferenciar



fácilmente ya que hidroliza la esculina, fermenta la glucosa, pero no tiene la capacidad de fermentar compuestos como el manitol, lactosa y ramnosa.^(4,7)



PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Producción Microbiológica es el encargado de generar los insumos necesarios para la entrega de material biológico para cada una de las prácticas de las diferentes carreras que se imparten en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Por ello se elaboró un manual que facilite la comprensión desde la identificación, la conservación y la entrega de los microorganismos que son necesarios para las prácticas de laboratorio que se llevan a cabo en las distintas carreras de esta institución, el manual incluirá información básica específica para realizar el cultivo, identificación y su conservación, el propósito del manual es el de facilitar la información de manera clara para llevar a cabo el proceso de identificación y conservación, el manual no tiene como finalidad sustituir literatura especializada, pero si tiene objetivo de recopilar la mayoría de información referente al tema.

Se integró información teórica general que expondrán por qué las cepas forman parte del cepario y se tratara poner énfasis en el control de calidad desde el proceso conservación, identificación, verificación de pureza, caracterización y utilidad. Es importante saber los métodos de conservación que dispone el Laboratorio de Producción Microbiológica y cuál es la finalidad para ser elegidos para la conservación de las cepas. Hoy en día la conservación de cepas tiene un papel relevante en cualquier área, desde el ámbito clínica, farmacéutica y epidemiológica.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un manual para identificación, conservación y abastecimiento de cepas microbianas en el cepario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que sirva como material de apoyo, con información precisa y exacta de métodos estandarizados para la identificación y conservación, con la adición de material gráfico, como el caso de fotografías, protocolos estandarizados, para llevar a cabo cada uno de los procesos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar una investigación y selección de información bibliográfica, sobre las características generales de cada una de las bacterias que forman parte del cepario, tomando criterios de morfología macroscópica y microscópica, clasificación, epidemiología y cuadro clínico.

Efectuar una investigación de los diferentes métodos de conservación de microorganismo que se encuentran disponibles hasta la actualidad, valorar pro y contra cada uno de ellos.

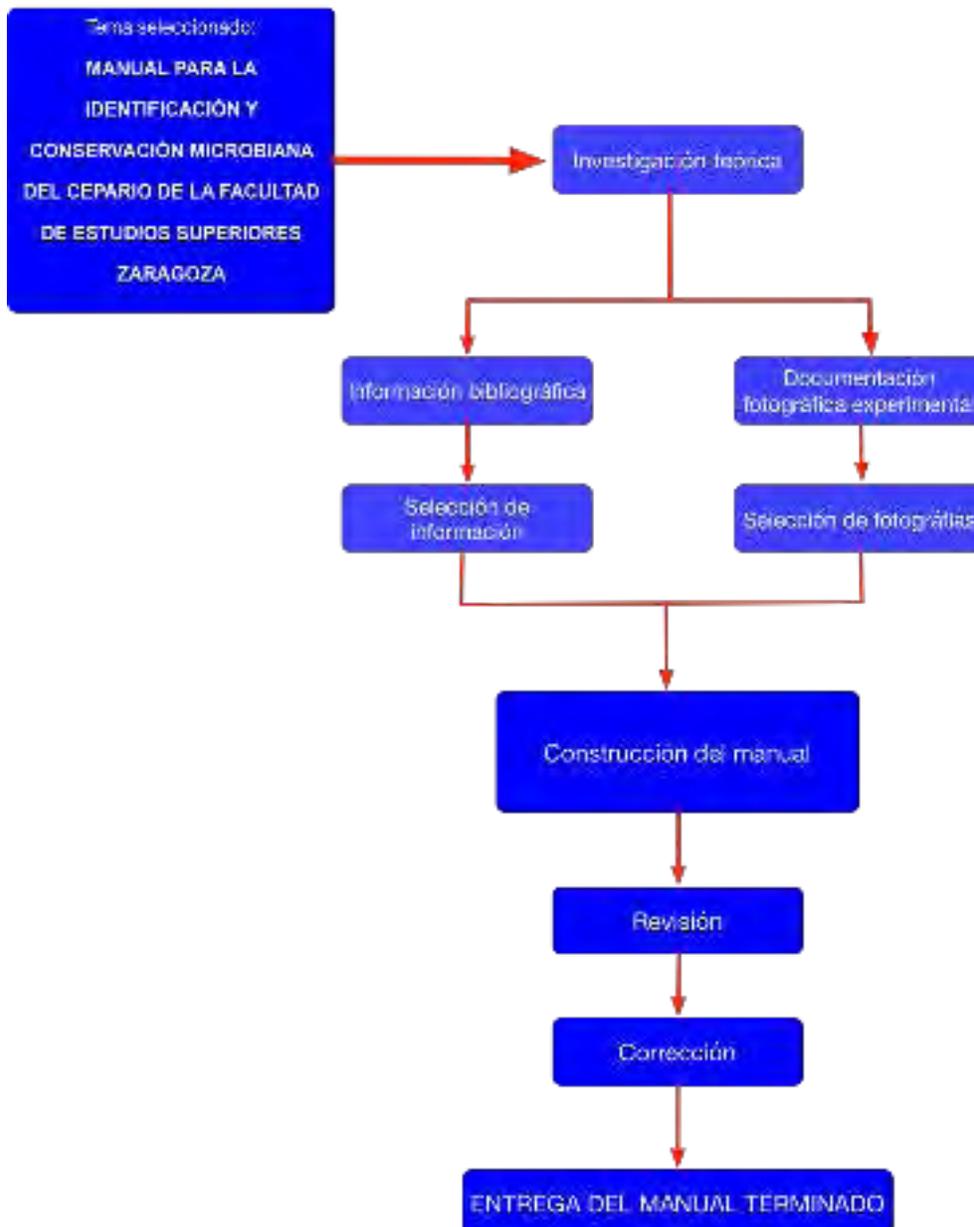
Desarrollar en el laboratorio las pruebas bioquímicas que sirven para identificar a los microorganismos que forman parte del manual, documentar cada uno de los protocolos para que sirvan como fuente fotográfica por parte del manual.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

- Experimental

METODOLOGÍA





RESULTADOS:

Se elaboró un manual que contiene información integral para la identificación y conservación de microorganismos que se tienen en el Laboratorio de Producción Microbiológico, es uno de los temas que no se revisa con tanta profundidad pero que es importante en en muchos campos como son la investigación, el laboratorio clínico y la industria.

El manual incluye una recopilación de información y que es ilustrado por la documentación experimental que se llevó a cabo en el laboratorio de Producción Microbiológico, la información y la documentación fotográfica se organizó en nueve capítulos:

Introducción y conceptos generales de microbiología.

Evolución y taxonomía.

¿Qué es una cepa?

Breve Historia de la microbiología.

Historia de la colección de cultivos.

Métodos de conservación.

Métodos y esquemas generales de Conservación por congelación y resiembra continua.

Tablas de descripción de bacterias Gram positivas.

Tablas de descripción de bacterias Gram negativas.

En el primer capítulo se revisan conceptos generales de la microbiología que son necesarios para comprender el manual

El segundo capítulo aborda el tema de la evolución y la taxonomía, de cómo los organismos son clasificados y se hace un especial énfasis que es un área que tiene un constante cambio



El tercer capítulo se centra en términos que se ocupan de manera frecuente en un cepario, para tener un panorama más amplio.

El cuarto capítulo da una breve historia de la microbiología y su desarrollo para poner en contexto su desarrollo, los hechos más notables y sobresalientes.

El quinto capítulo trata de la historia de la colección de cultivos y porque fue necesario el surgimiento de estos.

El sexto capítulo describe brevemente los métodos de conservación de microorganismos que son utilizados con mayor frecuencia.

El séptimo capítulo tiene los esquemas generales y el protocolo que se utiliza en los métodos de crioconservación y en los de resiembra continua

El octavo capítulo describe la morfología colonial, microscópica, el método de conservación, epidemiología, cuadros clínicos y los factores de virulencia que tienen la capacidad de provocar, o bien la utilidad que se les puede dar en el área industrial.

MANUAL PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL CEPARIO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



GILDARDO HERRERA
QUIROZ

Laboratorio de Producción
Microbiológica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Tabla de contenido

Tabla de contenido	1
Introducción	3
INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS GENERALES DE MICROBIOLOGÍA	4
Microbiología general o básica	5
Microbiología aplicada	5
EVOLUCIÓN Y TAXONOMÍA	6
Diversidad microbiana y su evolución.....	8
Clasificación, nomenclatura e identificación	10
Jerarquía taxonómica	12
¿Qué es una cepa?	16
Cepas tipo.....	16
La microbiología a través del tiempo	19
Desarrollo histórico de la microbiología	19
Postulados de Koch.....	21
La historia de las colecciones de cultivos	24
Funciones de una colección de cultivos (Biobank o Cepario).....	24
Breve historia de la colección de cultivos	25
Colecciones de cultivos en el mundo actualidad	26
Introducción a las técnicas de conservación	31
Técnicas de conservación	31
Técnicas de conservación a corto plazo	32
Métodos de conservación a largo plazo	36
Efectos del cambio de la temperatura	43
Efectos de la solución	46
Concentración celular	47
Tasas de descongelación	47
Criopreservación por vitrificación.....	49
Temperatura de transición vítrea (T_G).....	49
Conservación de microorganismos por liofilización (freeze-drying).....	50
Métodos y esquemas generales de Conservación por congelación y resiembra continua	57
Manejo de cepas de referencia.....	57
Control de calidad de cepas ATCC.....	59
Método de resiembra continua	62
Método de criopreservación con Leche Descremada y Glicerol	63
Fichas de identificación y conservación bacteriana	67
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> Rosenbach ATCC ® 6538™	67

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 14990	70
<i>Micrococcus luteus (lysodeikticus)</i> ATCC® 4698	73
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 12344	74
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 13813	77
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175	80
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6333 colonias lisas	82
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC ® 29212.....	84
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	86
<i>Corynebacterium xerosis</i>	89
<i>Rhodococcus equi</i>	90
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 14579	93
<i>Bacillus anthracis</i>	96
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	98
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	100
<i>Clostridium septicum</i>	102
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC® 19404.....	104
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	105
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis	112
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	116
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC® 13047.....	119
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 13048	122
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 49132.....	125
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 13315.....	127
<i>Serratia marcescens</i> ATCC® 13315.....	130
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC ® 27592.....	133
<i>Shigella flexneri</i> ATCC ® 9190	135
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853.....	138
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC® 13525	141
Bibliografía	144

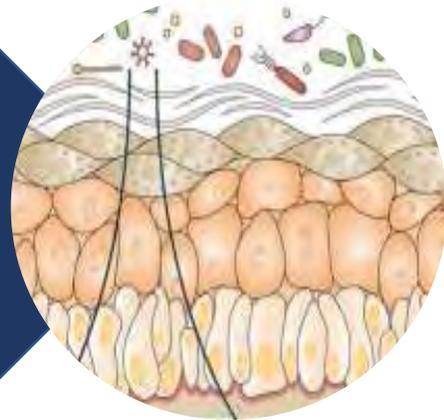
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Introducción

Hoy en día existen métodos internacionales para la conservación de microorganismos y los lugares donde son almacenados estos cultivos son llamado ceparios o cryobank, estos lugares deben de cumplir con la regularización y procedimientos adecuadas para identificación, conservación y almacenamiento de microorganismos. El método de elección que ocupan los cryobank para conservar a los microorganismos es por método de congelación, aunque existen otros métodos para la conservación de microorganismos, hasta el día de hoy la congelación de organismos tiene ventajas que facilitan su elección.

La ventaja más importante del método de congelación, es que solo es necesario descongelar la muestra y tomar con una pipeta de forma aséptica una porción de suspensión bacteriana e inocularlo en un medio adecuado para el desarrollo del microorganismo, la descongelación tiene inconvenientes cuando las cepas son almacenadas incorrectamente, porque el proceso de descongelación generará la formación de cristales, que dañaran a las bacterias y habrá una pérdida de viabilidad. Otra de las desventajas es el costo del método de conservación, la necesidad de un equipo que pueda mantener las suspensiones bacterianas a temperaturas menores a 0 °C. El objetivo de la tesis fue realizar un manual que describiera el procedimiento de identificación y conservación microbiana en el Laboratorio de Producción Microbiológico. Para llevarlo a cabo se seleccionaron 26 cepas bacterianas, las cepas bacterianas se activaron, se verificó su pureza y viabilidad, además de la identificación para cada una de las cepas.

INTRODUCCIÓN Y
CONCEPTOS
GENERALES DE
MICROBIOLOGÍA



CAPÍTULO 1

La microbiología es una rama de la ciencia que aborda el estudio de los microorganismos, que tienen como característica principal ser de un tamaño microscópico o submicroscópico, se puede definir como microorganismo a los organismos vivos demasiado pequeños para ser visualizados a simple vista, las bacterias, hongos, protozoos y algas microscópicas son ejemplos claros. Dentro de la microbiología hay particularidades como los virus que no pueden ser tomados de manera estricta como microorganismos, ya que no poseen una estructura celular, cuentan con una sola molécula de ácido nucleico, carecen de actividad metabólica y no tienen la capacidad de reproducirse por sí mismos, este tipo de organismos son conocidos como entidades biológicas, estas entidades no celulares que están consideradas en el límite entre lo vivo y lo inerte, también son estudiadas por la microbiología. (1,2)

Durante mucho tiempo varios tipos de microorganismos fueron estudiados por distintas áreas como la botánica y la zoología. A partir de 1970 la microbiología se desarrolló como una nueva y separada disciplina debido a la enorme diversidad

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

exhibida por los microorganismos. En su gran mayoría los temas de estudio que aborda la microbiología son la información sistemática sobre las características y actividades de los microorganismos, variaciones en su genoma, nuevos métodos de reproducción, su uso industrial y sus efectos nocivos (incluyendo la variedad de enfermedades que tienen la capacidad de producir), así como los efectos causados en elementos bióticos y abióticos en el medio ambiente. (2)

La microbiología como disciplina se puede subdividir en dos principales campos la microbiología básica o (general) y la aplicada.

Microbiología general o básica

Es la herramienta que permite la comprensión de procesos metabólicos generales, división celular y genética. Es la encargada del estudio de los microorganismos, su clasificación, diversidad, estructura, crecimiento, fisiología, procesos bioquímicos y su control. (3)

Microbiología aplicada

Es el área relacionada a los problemas de la medicina, ambiente, industria, producción y conservación de alimentos, la transformación de materia orgánica y mineral en todos los ecosistemas naturales, generación de energía, protección del ambiental y biotecnología, la microbiología aplicada aprovecha los conocimientos obtenidos por parte de la microbiología general y los aplica a una determinada área de la microbiología aplicada. (4)

Los organismos deben de cumplir con 5 principios característicos de las células vivas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Autonutrición: las células tendrán la capacidad de tomar sustancias químicas del medio ambiente y transformarlas con la finalidad de generar energía, durante este proceso también habrá formación de desechos.

Desarrollo: las células serán capaces de dirigir su propia síntesis. Cada Célula generará su propio crecimiento, y tendrá la capacidad de dividirse dando dos células hijas las cuales serán idénticas a la original.

Diferenciación: la gran mayoría de células pueden presentar cambios en su forma o función. La diferenciación suele ser parte del ciclo celular y es evidente cuando se forman estructura especializadas comprometidas con la reproducción sexual, la dispersión, la supervivencia en condiciones adversas.

Señalización química: las células tienen la capacidad de comunicarse o interactuar con otras células, a través de señales químicas.

Evolución: Es la introducción de cambios hereditarios como resultado de la selección natural, los cambios graduales ocurren a una velocidad baja pero regular en todas las células, en algunas ocasiones se seleccionan organismos mejor capacitados para vivir en determinadas condiciones o ambientes. ⁽³⁾

La microbiología a través de estudios de microscopía electrónica ha permitido reconocer diferencias de la organización subcelular de los organismos y permitió confirmar dos tipos de células diferentes: la eucariota (unidad estructural de animales, vegetales, protozoos, hongos y algas) y la procariota (característica de los microorganismos más simples como las bacterias e incluye algunas cianobacterias). ^(2,3)

Las células procariotas no poseen membrana nuclear, los cromosomas son circulares, el citoplasma presenta poca diferenciación, se encuentran protegidos por

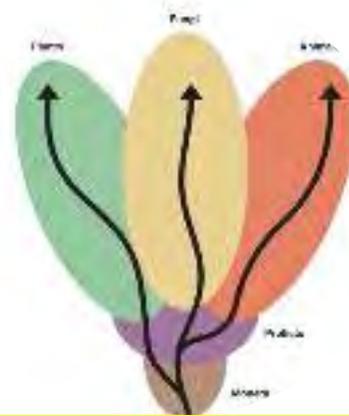
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

una membrana plasmática llamada pared celular y su reproducción es por fisión binaria, además carece de orgánulos. (4)

Aunque las células eucariotas presentan una extraordinaria diversidad, resultado de la especialización evolutiva, comparten una arquitectura básica: su material genético es lineal y se encuentra rodeado por una membrana, el conjunto de material genético y membrana es lo que conocemos como núcleo, la compartimentalización celular a través de sistemas membranosos ejemplos claros son el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico y poseen la capacidad de dividirse a través de mitosis o por una completa reproducción sexual.

Las diferencias entre células eucariotas y procariotas fueron confirmadas por estudios a nivel de función celular como lo es la transmisión de información genética, el tipo de metabolismos bioenergético, la capacidad de procesos de entrada y salida de sustancias en la célula. (3)

EVOLUCIÓN Y TAXONOMÍA



CAPÍTULO 2

Diversidad microbiana y su evolución

La tierra tiene 4500 millones de años de antigüedad. Pero la vida se calcula que surgió hace 4100 millones de años, se han encontrados fósiles bacterianos con una antigüedad de 3700 millones de años, en el área de la biología al proceso de la aparición de la vida a partir de materia inorgánicas se conoce como abiogénesis. El primer ser vivo que apareció en la tierra se le denomina progenote y uno de sus descendientes es LUCA (último ancestro común universal). LUCA tiene un papel preponderante ya que se cree que todos los seres vivos actuales provienen de este ancestro común, es importante hacer énfasis que LUCA no representa el estado más temprano de la evolución de la vida, la idea de que antes de la evolución de las proteínas y del DNA (los cuales son comunes a toda vida celular) hubo un periodo en el cual el RNA cumplió la función que ahora cumplen las proteínas y el ADN, esta idea es ampliamente aceptada. (5,6)

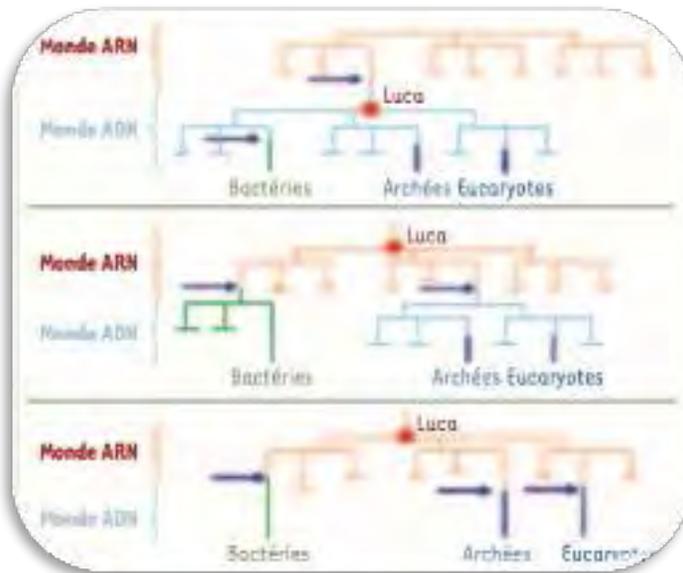


Ilustración 1 El origen de LUCA (7)

Las hipótesis señalan que el primer organismo primitivo fue un cianobacteria, la diversidad microbiana aumento probablemente hace unos 2,500 a 3,000 millones de años con la aparición del O_2 , la historia evolutiva de los seres vivos se puede estudiar a través de genes que codifican ARN ribosomal, ya que todas las formas de vida tiene ribosomas y en todos los seres vivos tienen la misma función y su secuencia de nucleótidos cambia muy poco, esto quiere decir que están muy conservada y permite una comparación precisa. (7,5,8)

C.R. Woese fue la primera persona en proponer esta idea, él fue el primero que secuenció y comparó estos genes de RNA ribosomal de distintos seres vivos, los resultados de Woese demostraron que cuando mayor es la variación en la secuencia de genes de dos organismos, mayor es su divergencia evolutiva. Las divergencias las representó de forma gráfica en forma de un árbol filogenético, que tiene la capacidad de medir las diferencias evolutivas. Los resultados permitieron proponer tres líneas evolutivas denominadas dominios, dos de los dominios representan a las células procariontes que son las células sin núcleo (Bacteria y Archaea), el tercer dominio representa a las células eucariotas (Eukarya). (6,8)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Dominio Archaeae: son microorganismos que a menudo viven en ambientes extremos y sus procesos metabólicos no son habituales, se caracterizan por carecer de peptidoglicano en sus paredes celulares, el grupo Archaeae incluye tres grupos principales los cuales son Metanógenos, halófilos extremos e hipertermofilos.

Dominio Bacteria: Este dominio incluye la mayoría de los procariontes patógenos y no patógenos hallados en el suelo y en agua.

Dominio Eukarya: Este dominio incluye animales, vegetales, hongos, los protistas y se caracterizan por tener como unidad fundamental las células eucariotas. (9,10)

Clasificación, nomenclatura e identificación

La taxonomía es la ciencia de la clasificación de los organismos. La taxonomía bacteriana tiene tres componentes separados, pero son áreas interrelacionadas: clasificación, nomenclatura e identificación. Sin alguna de estas tres áreas no se podría tener la capacidad de identificar los organismos existentes, ni reconocer a microorganismos que anteriormente no estaban clasificados. (11)

La clasificación es el arreglo de los organismos en grupos (taxones), con base a sus similitudes o relaciones.

La nomenclatura es la asignación de nombres a los taxones o grupos de acuerdo a las reglas internacionales (*International Code of Nomenclature of Bacteria*).

La identificación es el uso práctico de un esquema de clasificación para determinar la identidad de un aislado como un miembro de un establecido taxón o como un nuevo miembro de especie previamente no identificado. (12)

La clasificación y la adecuada descripción de bacterias requieren conocimientos de su morfología, bioquímica, fisiología, así como de las características genéticas. La

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

taxonomía como ciencia es dinámica, tiende a estar sujeta a cambios con base a la disponibilidad de datos nuevos. Nuevos hallazgos hacen necesarios los cambios en la taxonomía, los efectos de estos hallazgos se hacen presentes en la clasificación existente, en la nomenclatura, en los criterios para la identificación y en el reconocimiento de nuevas especies fundamentalmente. El proceso de clasificación puede ser aplicado a taxones existentes, ya nombrados o para nuevos organismos recientemente descritos. En dado caso de que los taxones ya fueran anteriormente descritos, nombrados o clasificados, nuevas características pueden ser añadidas o las características existentes pueden ser reinterpretadas para una clasificación existente, con el propósito de actualizar la clasificación o formular una nueva. Si el organismo es nuevo, no puede ser identificado como un taxón existente, es nombrado y descrito según las reglas de nomenclatura y colocado en una posición adecuada en una clasificación existente, por ejemplo, una nueva especie en una ya existente o un nuevo género. (13)

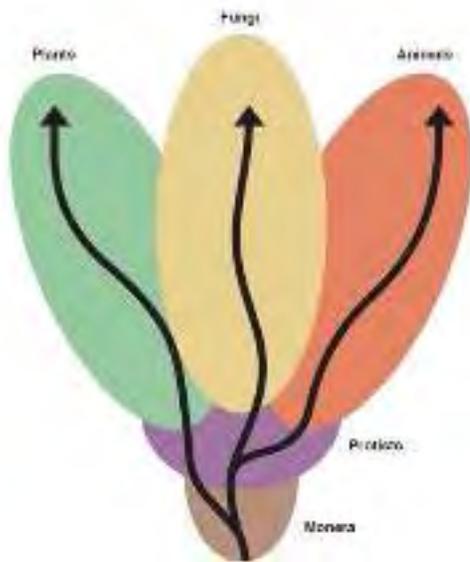


Ilustración 2 Árbol de relación que conecta cinco reinos. (9)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Jerarquía taxonómica

Es un arreglo convencional por rangos que tiene un nivel básico (especie), los niveles por encima del nivel básico son más inclusivos, algunas veces el nivel más básico que es utilizado en microbiología es el rango de subespecie, los principales rangos en orden decreciente son: (Ver Tabla 0.1)

Tabla 0.1 Rangos taxonómicos (10)

Rango taxonómico **Ejemplo**

<i>Dominio</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Filo</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Clase</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Orden</i>	<i>Legionellales</i>
<i>Familia</i>	<i>Legionellaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Legionella</i>
<i>Especie</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Subespecie</i>	<i>Legionella pneumophilla subesp.pneumophilla</i>

Son varios los métodos por los cuales se ha buscado la relación taxonómica entre especies, las primeras pruebas de clasificación fueron los patrones generales morfológicos y bioquímicos, posteriormente se añadieron otras cualidades como patogenicidad y rangos de huésped. La verdadera relación filogenética comenzó con las pruebas de hibridación de DNA, estas pruebas dieron las primeras comparativas entre especies bacterias. Los taxonomistas hoy en día se apoyan en todas las técnicas anteriores además de la secuenciación del gen 16s del rRNA.

(10,13)

El análisis a través de la secuenciación del gen 16s del rRNA ha demostrado ser únicamente y en gran parte el método más extenso para la clasificación de un

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

microrganismo, pero algunas veces se ha evidenciado que no es una prueba suficientemente sensible para discriminar entre dos especies estrechamente relacionadas. Se han establecido reglas generales para la creación de nuevas especies cuando se analizan secuencias genéticas relacionadas entre bacterias, cuando se ocupa el método de secuenciación son consideradas dos bacterias de la misma especie cuando la similitud de la secuencia del ARNr es igual o mayor al 97%, son consideradas dos bacterias de diferente especie cuando hay una divergencia menor o igual al 3%. (10)

En la ciencia de la microbiología hay varias definiciones que son importantes de manejar para la caracterización, clasificación e identificación de una cepa.

Género: Todas las especies son asignadas a un género, el cual es definido de manera funcional como un grupo que puede albergar una o más especies con características fenotípicas generales similares que son compartidas por los integrantes del grupo.

Especie: es el rango más básico y es el grupo taxonómicamente más importante en la sistemática bacteriana. El concepto de una especie es menos definitivo para organismos superiores. Esta diferencia no debe de parecer sorprendente, porque las bacterias, siendo los organismos procariontes, difieren marcadamente de los organismos superiores que forman otros reinos. El término de especie que es aplicado en bacteriología ha sido definido como un grupo distinto de cepas que tienen ciertas características distintivas y que generalmente tienen una semejanza cercana entre sí en las características más esenciales de la organización. Una cepa está conformada por los descendientes de un único aislamiento de un cultivo puro, generalmente está conformada por una sucesión de cultivos. Cada especie difiere considerablemente y puede diferenciarse de otras especies. (10,14,15)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Subespecie: una especie puede ser subdividida en dos o más subespecies tomando en cuenta las variaciones bioquímicas consistentes o en grupos de cepas determinadas genéticamente dentro de una especie.

Hay un rango por debajo del nivel básico de subespecie, este tipo de rangos sirve para distinguir algunos grupos por sus distintas variedades y características especiales de identificación como lo son su composición antigénica, por propiedades fisiológicas particulares, la capacidad de ser lisados por cierto tipo de bacteriófagos, una morfología especial o característica y por propiedades patogénicas para ciertos tipos de hospedero, este tipo de clasificación es llamada infrasubespecífica aunque no es reconocida como una forma formal de clasificación si es utilizada ampliamente. (10,13,14)

Tabla 0.2 Designación Infrasubespecífica (10)

Nombre **Sinónimo** **Definición**
sugerido

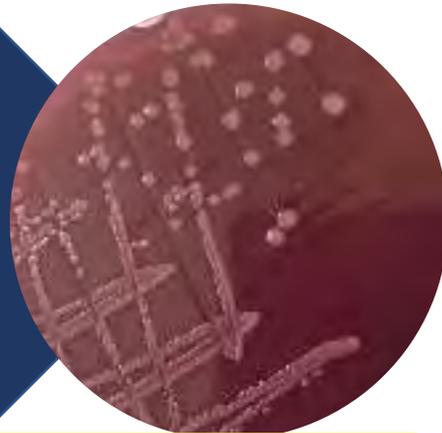
Nombre	Sinónimo	Definición
<i>Biovar</i>	Biotipo	Propiedades especiales bioquímicas o fisiológicas
<i>Serovar</i>	Serotipo	Propiedades Antigénicas distintivas
<i>Patovar</i>	Patotipo	Propiedades patogénicas para ciertos hospederos
<i>Fagovar</i>	Fago tipo	Especificidad para ser lisados por ciertos bacteriófagos
<i>Morfovar</i>	Morfotipo	Características especiales en morfología

En el campo de la microbiología es aceptada la nomenclatura binomial de Linneo, en donde los organismos son designados por la combinación del rango taxonómico de género y especie para formar su nombre científico el cual permitirá identificar a cada una de las especies, los nombres de las especies están latinizados, existen particularidades cuando se escribe el nombre de una especie determinada por la nomenclatura binomial, cualquier microorganismo llevara primero el nombre del

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

género, la primera letra del género será escrita con mayúscula e irá seguido por el nombre de la especie la cual será escrita en letras minúsculas, los nombres científicos para cada especie tendrán que ir en cursivas para recordar que son nombre científicos latinizados. (10,13,14,15)

¿Qué es una
cepa?



CAPÍTULO 3

Una cepa se puede definir como todas las células descendientes de un solo aislado en un cultivo puro, de manera recurrente las cepas son generadas a partir de una sola colonia. (10,16,17)

Cepas tipo

Son denominadas cepas tipo a las cepas de una especie determinada, cuando sirven como portadora del nombre (etiqueta) de la especie, siendo el ejemplo claro y permanente de una especie, dicho de otra manera, es el espécimen de referencia para el nombre. Las cepas tipo son de gran importancia para llevar a cabo la clasificación a nivel de especie. Todas las especies están compuestas por la combinación de la cepa tipo, así como por otras cepas que se consideran suficientemente similares a la cepa tipo y que justifican la inclusión en la especie. Es de vital importancia destacar que cualquier cepa puede denominarse cepa tipo para cualquier especie, pero para las nuevas especies reconocidas normalmente es designada como cepa tipo la primera cepa que es aislada. (16,17)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Autenticación: Es el proceso por el cual se comparan las características de una cepa, con la descripción de la especie con el objetivo de determinar o verificar la identidad de la cepa.

Caracterización: Es el proceso por el cual una cepa es sometida a una batería de pruebas morfológicas, fisiológicas, moleculares u otras, con finalidad de generar datos para utilizarlos para describir o compararla objetivamente con otras cepas.

Cultivo: es una población de células colocadas en un lugar determinado en un momento dado. Ejemplos un tubo o en una placa de agar. (16,17)

Cultivo maestro (Master culture): Cultivo derivado directamente del cultivo de referencia (ejemplos viales obtenidos de ATCC u otra organización que colecciona cultivos), es importante que se realicen muchos cultivos maestros a partir del cultivo de referencia y que estos sean conservados a través de un método estandarizado (liofilización, criopreservación, ultracongelación o por resiembra continua), los cultivos maestros se les da una función de controles internos. (18)

Pase: es el proceso de transferir un inóculo de células de un cultivo existente a un nuevo medio de crecimiento fresco, con la finalidad de lograr el crecimiento en la población de células. Cada proceso de transferencia (subcultivo), se cuenta como un pase adicional.

Cultivo puro (Axénico): cultivo que contiene solo una especie de microorganismo.

Cepa para control de calidad: Son las cepas previamente determinadas para cumplir criterios de rendimiento para una prueba en particular. (16,17,18,19,20)

Cultivo de origen (Seed Stock): Es la definición utilizada para referirse de manera general a las cepas que contienen organismos de referencia que son

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

proporcionadas por colecciones de cultivo, son almacenadas bajo condiciones óptimas y son utilizadas para generar los cultivos de distribución. Este tipo de cepas son trabajadas de tal manera que se evite el menor número de pases, evitando la contaminación o alteración genética. (16)

Cultivo de distribución (Distribution stock): Es un cultivo derivado de un cultivo de origen, este tipo de cultivo es diseñado para su distribución y son los enviados por parte de las colecciones de cultivos a los laboratorios que lo solicitan, es verificada su viabilidad y pureza. Antes de ser enviada es caracterizada para ser comparada con respecto al cultivo en existencia.

Cultivo de reserva: es un cultivo derivado de un cultivo maestro o un cultivo de referencia y es utilizado como un reactivo con regularidad. (19,20)

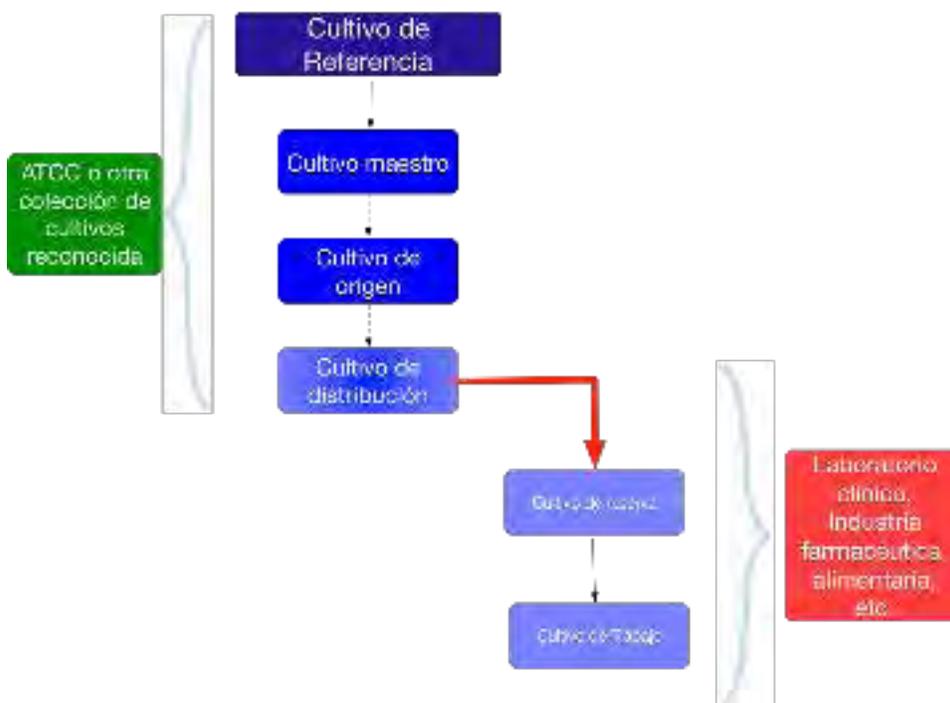


Ilustración 3 Generación y manejo de una cepa de referencia.

La microbiología a través del tiempo



CAPÍTULO 4

Desarrollo histórico de la microbiología

Aunque la relación del ser humano con los microorganismos ha sido durante toda la historia de la humanidad e incluso sin tener el conocimiento de la convivencia, así como la relación tan estrecha que se ha compartido, no fue hasta el año de 1665 cuando se logró uno de los descubrimientos más importantes para la biología que fue la observación a través de un microscopio rudimentario. Fue un inglés llamado Robert Hooke quien realizó las primeras observaciones al mundo microscópico, informando al mundo que las unidades estructurales de la vida eran “Celdillas pequeñas” o “células” como el mismo las denominó. El descubrimiento de Hooke fue importante para sustentar la teoría celular, la teoría postula que todos los organismos vivos están compuestos por células. (4,21)

Años más tarde entre 1673 y 1723 fue un comerciante holandés llamado Anton Van Leeuwenhoek el primer ser humano en ver microorganismos vivos, el holandés tenía una habilidad excepcional para construir microscopios, está documentado

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

cada uno de sus observaciones por las cartas enviadas a la Royal Society de Londres. Describió las células que observó como “animáculos”, además de realizar dibujos detallados de microorganismos provenientes de distintas fuentes como el agua de lluvia, de sus propias heces y de material obtenido por el raspado de sus propios dientes. Hoy en día estos dibujos se han identificado como bacterias y protozoos, este hecho es uno de los capítulos más importantes de la microbiología que permitió abrir la curiosidad para un mundo nuevo e invisible hasta ese momento.

(22)

La ciencia de la microbiología ha refutado teorías que existieron por siglos enteros, uno de los grandes aportaciones fue la supresión de la teoría de la generación espontánea (cualquier microorganismo es generado de manera espontánea de cualquier material inerte), aunque hubo varios científicos que trataron de demostrar que la teoría de la generación espontánea no era viable, no lograron convencer a sus detractores, fue hasta que Luis Pasteur demostró a través de un experimento ingenioso utilizando matraces de cuello largo, concluyó con este experimento que toda célula viva solo podría surgir de otra célula ya existente, es lo que hoy se conoce como biogénesis. Es importante que además de la refutación de la teoría de la generación espontánea, Pasteur realizó estudios de los procesos de fermentación, logrando demostrar que son las levaduras los microorganismos que llevan a cabo este proceso, pocos años después logró desarrollar un proceso llamado pasteurización que tiene como finalidad evitar el deterioro de la leche o el vino además de tener la habilidad de destruir las bacterias que pueden llegar a ser lesivas en alimentos como la leche. (23,24)

Fue hasta el año de 1876 cuando Robert Koch descubrió que un microorganismo era el causante de una enfermedad conocida como carbunco, este microorganismo estaba destruyendo el ganado bovino y vacuno en toda Europa. Koch descubrió en los cuerpos muertos de los animales pequeñas bacterias con forma de bastón que hoy en día se conoce como *Bacillus anthracis*, logró aislarlos en medios de cultivos nutritivos, estos mismos cultivos los utilizó para inocular animales sanos, fue aquí

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

donde ocurrió el gran descubrimiento, los animales enfermaron y murieron, todo el trabajo anterior hecho por Robert Koch estableció una secuencia de pasos experimentales para relacionar un microorganismo específico con una enfermedad específica. Hoy en día estos pasos experimentales son conocidos como los postulados de Koch. (21,23)

Postulados de Koch

- El agente patógeno debe estar presente en todos los casos de enfermedad y ausente en los casos sanos.
- El microorganismo debe de ser aislado del hospedero enfermo.
- El agente aislado debe provocar la enfermedad en un animal experimental susceptible al ser inoculado.
- El agente patógeno debe de ser aislado nuevamente.

Fue Koch el primer microbiólogo en asociar a los microorganismos como productores de enfermedades, pero hasta ese momento, aunque se tuviera la certeza de que un microorganismo causara una enfermedad no se había desarrollado un método para matar al microorganismo y erradicar la enfermedad, sucedió hasta el año de 1910 cuando irrumpió a escena un médico alemán llamado Paul Ehrlich. Cuando todavía era un estudiante imaginó una bala mágica que tuviera la habilidad de llegar hasta donde se encontraban los microorganismos patógenos y además tuvieran la capacidad de matarlos. Empezó una búsqueda exhaustiva de su bala mágica, probó varias sustancias que pudieran servir para este proceso. Ehrlich fue el primer individuo en encontrar el primer agente quimioterapéutico (Salvarsan) y lo utilizó para el tratamiento de la sífilis. (24)

El descubrimiento del primer antibiótico se dio de manera accidental, Alexander Fleming un médico escocés, tuvo la curiosidad de observar placas que estuvo a punto de tirar, estas placas tenían el crecimiento de un hongo filamentoso que contaminaba los cultivos bacterianos que había inoculado, Fleming observó un patrón de crecimiento característico alrededor del crecimiento del hongo

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

filamentoso, había una zona clara, dicho de otra manera, el crecimiento bacteriano estaba inhibido. Fleming encontró un hongo que tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de una bacteria, este hongo hoy en día lo conocemos con el nombre de *Penicillium chrysogenum* y es a través de la producción de una sustancia llamada penicilina que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.

	1673	van Leeuwenhoek: primera observación de microorganismos vivos
	1735	Linnaeus: nomenclatura de los microorganismos
	1798	Jenner: primera vacuna
	1835	Bassi: hongo del gusano de seda
	1840	Semmewels: fiebre puerperal
EDAD DE ORO DE LA MICROBIOLOGÍA	1857	Pasteur: fermentación
	1861	Pasteur: desaprobación de la generación espontánea
	1864	Pasteur: pasteurización
	1867	Lister: cirugía aséptica
	1876	Koch: teoría germinal de la enfermedad
	1879	Neisser: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	1881	Koch: cultivos puros Finley: fiebre amarilla
	1882	Koch: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hess: Medio sólido
	1883	Koch: <i>Vibrio cholerae</i>
	1884	Metchnikoff: fagocitosis Gram: Técnicas de tinción de gram Escherich: <i>Escherichia coli</i>
	1887	Petri: Creación de cajas Petri
	1889	Kitasato: <i>Clostridium tetani</i>
	1890	von Bering: antitoxina diftérica Ehrlich: teoría de la inmunidad
	1892	Winogradsky: ciclo del azufre
	1898	Shiga: <i>Shigella dysenteriae</i>
	1908	Ehrlich: sífilis
	1910	Chagas: <i>Tripanosoma cruzi</i>
	1911	Rous: virus productores de tumores
	1928	Fleming, Chain and Florey: penicilina Griffith: transformación de bacterias
	1934	Lancefield: antígenos estreptocócicos
	1943	Delbrück y Luria: infección de bacterias por virus.
	1944	Avery, MacLeod y McCarty: el material genético es el DNA
	1946	Lederberg y Tatum: conjugación bacteriana

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

1953	<i>Watson y Crick: Estructura del DNA</i>
1959	<i>Stewart: Causa viral del cáncer humano</i>
1962	<i>Edelman y Porter: Anticuerpos</i>
1981	<i>Marulis: origen de las células eucariontes</i>
1983	<i>McClintock: transposones</i>
1997	<i>Prusiner: priones</i>

Tabla 0.3 Breve Historia de la microbiología (4)

La historia de las colecciones de cultivos



CAPÍTULO 5

Funciones de una colección de cultivos (Biobank o Cepario)

Los biobank, ceparios o colección de cultivos tienen como función primaria recolectar, mantener y distribuir cepas microbianas ordenadas por los laboratorios de microbiología para ser usadas en procesos de enseñanza, investigación, ensayos de control de calidad y biotecnología. Es importante mencionar que las colecciones de cultivos son consideradas ser el medio para preservar la diversidad microbiana ex situ. La necesidad de crear colecciones de cultivos es debido a la enorme diversidad que representan los microorganismos. (25,26,27,28)

Las colecciones de cultivos deben de ofrecer los siguientes servicios a la comunidad microbiológica, estos laboratorios se deben de encargar de la recolección de cepas microbianas de diferentes fuentes, así como de preservar y conservar las cepas por

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

métodos que permitan su viabilidad por periodos de tiempos largos evitando los cambios genéticos que pueden ser provocados por los métodos de conservación

otro de los servicios importantes es el envío de cepas que sean solicitadas asegurándose cumplir las normas de seguridad. Colectar datos de cada una de las cepas conservadas dentro de una colección de cultivos y hacerlos accesibles a los investigadores, actuar como un depósito de seguridad para cepas de distribución restringida, proveer el servicio de identificación de acuerdo a la experiencia, servir como depósito de cepas, organizar cursos de formación relacionados con la identificación y la conservación de cepas. Llevar acabo investigación relacionada principalmente con taxonomía y preservación microbiana, así como de proporcionar asesoramiento en el campo de la microbiología. (26) (27) (29)

Breve historia de la colección de cultivos

La colección de cultivos es como una librería, pero en lugar de libros estas almacenan material vivo, la primera colección surgió cuando se integró al campo de la bacteriología la técnica de cultivo puro, enseñada por Robert Koch y sus colaboradores, pero fue hasta el año de 1890 cuando la primera colección de cultivos que se estableció y empezó a dar servicio, Frantisek Král fundó la primera colección en el mundo, teniendo como sede la German University of Prague (República Checa). En 1900 Král publicó por primera vez el catálogo de cepas disponibles, en 1911 fallece el profesor Král, este hecho es de suma importancia debido que la colección tuvo que ser transferida en el año de 1927 a la State Serum Institute in Vienna, el encargado de la colección en Viena fue el profesor Ernst Pribram, poco años después Pribram dejó su cargo en la universidad de Viena y se unió a la Loyola University de Chicago, en el momento de la partida Pribram tomó una parte de la colección de Král, la parte que se mantuvo en Viena desafortunadamente fue destruida durante la segunda guerra mundial. (25,30)

Después de la colección de Král, otras colecciones de cultivo fueron fundadas, en la actualidad las colecciones más antiguas que siguen ofreciendo su servicio hasta

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

el día de hoy son Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain que se encuentra en Louvain-la-Neuve Bélgica, esta colección fue creada en el año de 1894, la segunda colección más antiguas es la Collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures que se encuentra en la ciudad de Utrecht en Holanda, esta colección fue fundada desde 1906. Desde entonces muchas colecciones han sido creadas, algunas de ellas son para propósitos generales, algunas son especializadas con ciertas especies de microorganismos y otras colecciones están orientadas a ofrecer servicios generales. Hasta el año de 1925 fue cuando se creó la bien conocida American Type Culture Collection (ATCC) siendo fundada en el estado de Washington, hoy en día está localizada en Manassas, Virginia, esta colección es una de las más importantes a nivel mundial ha sido tan relevante que en el año de 1947 empezó a servir como centro de almacenamiento y distribuidor mundial de cultivos de microorganismos, convirtiéndose en los últimos años en el líder mundial en el desarrollo de conocimientos especializados para la identificación, caracterización, preservación y distribución de una amplia gama de microorganismos y líneas celulares. (25,30)

Colecciones de cultivos en el mundo actualidad

Las colecciones de cultivos han tomado un rol transcendental para proveer material biológico con altos estándares de calidad, con la finalidad de basar investigaciones, además de tener un fuerte impacto a la industria. Las exigencias para las colecciones de cultivos han cambiado con las nuevas tecnologías y el nuevo uso que se les está dando a los microorganismos. Las colecciones de cultivos han sido llamadas por la OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) como Biological Resource Centre (BRC), estos centros de fuentes biológicas como son llamadas en español, operan de acuerdo a criterios internacionales de calidad, llevando a cabo investigación esencial con la finalidad de aumentar la aplicación de las cepas y ser fuente de información vital. (25,26)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Desde 1963 fue fundada The World Federation for Culture Collections (La Federación Mundial de colección de cultivos o WFCC), es el máximo organismo internacional de intercambio de información sobre la colección de muestras microbiológicas tiene como objetivo promover y apoyar la creación de colecciones de cultivos, así como servicios relacionados, además de proporcionar enlaces estableciendo una red de información entre las colecciones y sus usuarios. Las colecciones que son miembro de la WFCC están registradas en el World Data Center for Microorganisms (Centro Mundial de Datos para Microorganismos o WDCM). (25,31)

El WDCM hasta el 31 de agosto del 2013 en el informe de su sexta versión contaba con un registro de 647 colecciones que formaban parte de los miembros de la WFCC, estas colecciones provenían de 70 países distintos. El número total de cepas que suman las colecciones de cultivos registradas es de 2, 365, 2799 cepas.



Ilustración 4 Indica el número de colecciones de cultivos registrados en diferentes países y regiones, para el caso de México cuenta con 18 colecciones de cultivo. (32)

El número de colección cultivos registrados en el WDCM va en aumento año tras año, aunque el mayor objetivo de la WFCC es la creación de nuevos colección de

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

cultivos, muestra gran interés por mantener y recuperar las colecciones que han estado registradas por mucho tiempo. (32)

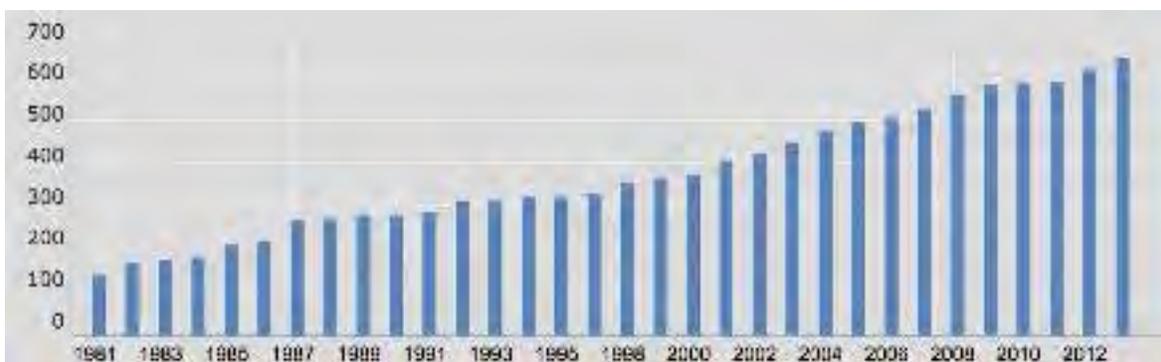


Ilustración 5 El gráfico muestra el aumento de registros de colección de cultivos y el aumento año tras año

En el caso de la región de América, hay un total de 153 colecciones de cultivos registrados ante la WFCC y en el caso particular de México cuenta con 18 Colecciones y un total de 9078 cepas registras que forman parte de la WFCC. (32)

Tabla 0.4 Número de colecciones de cultivos registrados en la región del continente americano WFCC (32)

País	Número de colección de Cultivos	Número de cultivos
Argentina	12	7094
Brasil	65	176902
Canadá	18	82315
Chile	1	0
Colombia	2	4474
Cuba	9	6336
Ecuador	1	2700
México	18	9078
Estados Unidos	24	242436
Venezuela	3	2984

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Total	153	534319
--------------	-----	--------

Es importante mencionar que hay 2, 365, 799 cepas que están registradas en la WFCC, pero es importante señalar que solo 1,020,206 son bacterias; 646, 758 de las cepas son hongos; 36, 791 son virus y 31, 178 son cepas pertenecientes a una línea celular ⁽³²⁾

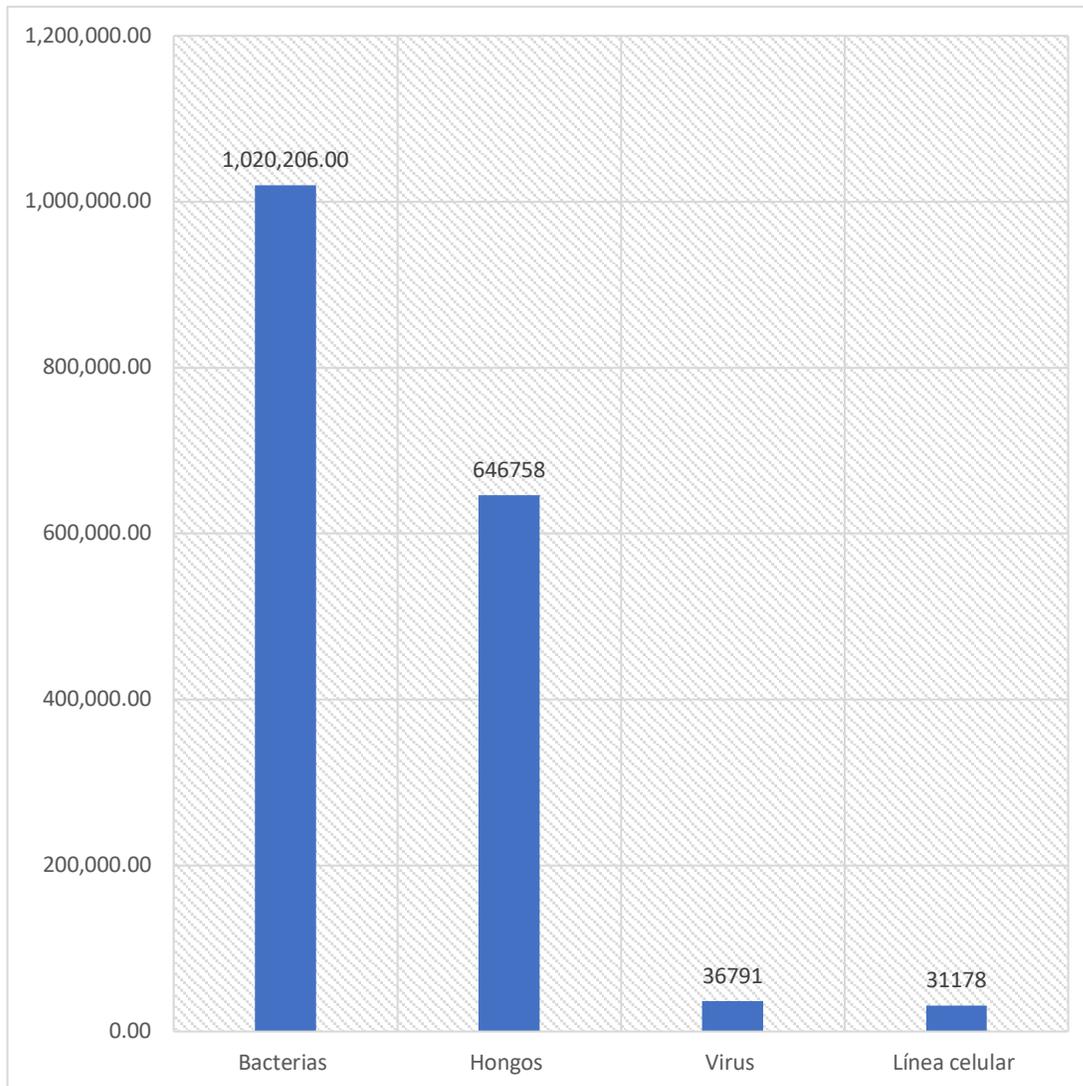


Ilustración 6 Distribución del material biológico que ha registrado por The World Federation for Culture Collections.

En México destaca la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (WFCC 500), esta Colección está resguardada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) y es reconocida como el centro

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Número WDCM	Colección
WDCM 834	Culture Collection of Fungal Pathogens Strains from the Basic Mycology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, UNAM
WDCM 813	Collection of Aquatic Important Microorganisms
WDCM 1047	Colección de microorganismos biorracionales
WDCM 500	Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos celulares
WDCM 757	Centro Nacional de cultivos microbianos (National Center For Microbial culture
WDCM 100	Cepario de la Facultad de Química
WDCM 1034	Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico
WDCM 95	Verticillium dahliae from cotton
WDCM1006	Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos genéticos
WDCM 449	Colección de cultivos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
WDCM 584	Free-Living Amoebae Culture Collection
WDCM 782	Cepario de Hongos Del Instituto de Ecología
WDCM 48	Industrial Culture Collection
WDCM 121	Pathogen Fungi and Actinomycetes Collection
WDCM 104	Colección de Microhongos
WDCM 99	Colección de Cepas Microbianas
WDCM 817	Culture Collection of Histoplasma capsulatum Strains from the Fungal Immunology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, UNAM
WDCM 971	Banco de Germoplasma de hongos micorrizios orquideoides

de Recurso Biológicos (BRC) por la Comisión Nacional para Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio) y reservorio de cultivos microbiano ex situ en México, la colección está conformada por cepas bacterianas, hongos filamentosos y levaduras.⁽³³⁾

Tabla 0.5 Lista de colección de cultivos en México, Datos disponibles en la sexta versión informativa de WFCC ⁽³³⁾

Introducción a las técnicas de conservación



CAPÍTULO 6

Técnicas de conservación

Muchos de los laboratorios de microbiología mantienen cultivos almacenados, para educación, investigación, bioensayos u otros propósitos. La bioconservación es el proceso por el cual se conservan integridad y funcionalidad de las células, tejidos, así como órganos fuera de su entorno nativo por periodos largos de tiempo. ⁽³⁴⁾

La adecuada conservación de cultivos es muy importante, en muchas ocasiones la mala conservación de cultivos ha obstaculizado una investigación por la pérdida de un microorganismo o su variación. Se han descrito varios métodos para llevar a cabo la conservación de microorganismos, el objetivo principal que tiene que cubrir un método es mantener viable al microorganismo, evitando los cambios genéticos y mutaciones. Es importante mencionar que la conservación de un cultivo se debe de llevar a cabo manteniendo la mayor cercanía a nivel de características al cultivo original aislado por primera vez. ^(34,35)

Aunque se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la conservación de cultivos, no todas las especies responden de la misma manera para un método

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

determinado, incluso algunas cepas de la misma especie dan resultados variables ocupando el mismo método. Es importante señalar que el éxito de cualquier método de conservación depende de la correcta elección del medio, así como el método elegido y la edad de cultivo al momento en que se lleva a cabo la conservación. Las observaciones anteriores se acentúan cuando los cultivos a conservar contienen plásmidos, DNA recombinante o exhiben fases de crecimiento como formación de esporas o morfogénesis. (34,35)

Los métodos de conservación se dividen en dos grupos principalmente, los métodos de conservación a corto plazo y largo plazo, la elección del método depende de varios factores, pero entre los principales son la disponibilidad de mano de obra calificada, equipo y espacio de almacenamiento.

Técnicas de conservación a corto plazo

Subcultivo (Transferencia continua)

Es un método tradicional de conservación de microorganismos y es usualmente utilizado en el campo de la bacteriología, este es un proceso donde una cepa es periódicamente subcultivada a medio fresco, los intervalos entre cada transferencia debe de ser determinado, estos intervalos varían de acuerdo a la especie que se esté trabajando, hay bacterias que deben de ser transferidas a diario mientras que otras cepas pueden necesitar ser subcultivadas después de varias semanas o meses, la mayor desventaja de este método son el riesgo de manipulación, el etiquetado erróneo de una cepa, la selección de variantes o mutantes y en el caso más extremo es la pérdida del cultivo. Es uno de los métodos que necesita un mayor espacio de almacenamiento y que genera una sobre carga de trabajo cuando se tiene una colección grande. (36)

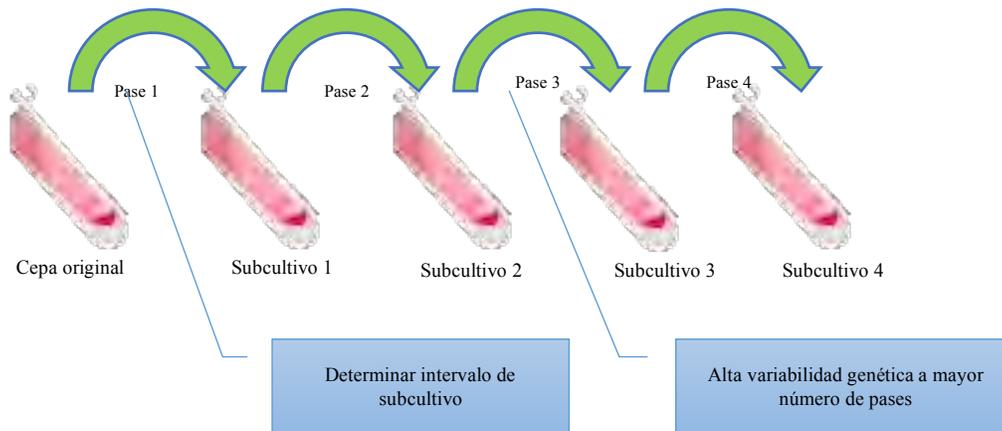


Ilustración 7 Transferencia continua

Inmersión en aceite

Este método permite conservar cepas de bacterias y hongos por lapsos de 2 a 3 años, la ventaja que ofrece este método es que alarga los periodos de transferencia, la importancia de alargar los periodos es que tiene como objetivo evitar la selección de variantes genéticas o mutaciones. Uno de los factores a considerar es la calidad del aceite mineral que debe de cumplir con una gravedad específica de 0.865 a 0.890, debe de ser esterilizado por calor seco durante dos horas a 180 °C, está contraindicado la esterilización del aceite por medio de calor húmedo (esterilizar por autoclave), la inmersión en aceite se puede llevar a cabo en agar inclinado o medio líquido, los medios son inoculados con la bacteria que se quiere conservar y se deja crecer, una vez que se obtiene el crecimiento necesario es recubierto por el aceite mineral, en el caso del medio líquido se debe de formar una capa que recubre mínimo dos centímetros, en el caso del agar inclinado la cantidad de aceite que se ocupa es el necesario para recubrir la totalidad de la inclinación, la capa de aceite sirve para evitar la desecación del medio, reduce la actividad metabólica y el crecimiento del cultivo debido a la falta del intercambio de oxígeno. (37,38,39)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Congelación ordinaria

La conservación de bacterias a través de un congelador doméstico, en un rango de temperatura de 0 °C a -20 °C produce resultados variables, la utilidad de este método depende de la especie que se trate de conservar, el periodo mínimo rendimiento de conservación que se ha reportado para cepas exigentes es de 6 meses y se han obtenido máximos rendimientos para cepas no exigentes de dos años, este método no es recomendado para la conservación de cepas microbianas porque el mismo proceso daña las células por la formación de cristales de hielo. Los congeladores domésticos cuentan con un sistema que funciona a través de ciclos de calentamiento-enfriamiento que evitan la formación de escarcha, este mismo sistema hace que se provoque aún más daños a la viabilidad de los microorganismos.

(36,40,41)

Deshidratación

Aunque la mayor parte de los microorganismos no puede sobrevivir al proceso de deshidratación, principalmente los hongos filamentosos y las bacterias formadoras de esporas son los organismos adecuados para conservar por este método, la ventaja de este método es que los organismos que se pueden conservar dan periodos más prolongados e índices altos de supervivencia, el medio de conservación que se ocupa en los métodos de deshidratación son la tierra estéril, uno de los inconvenientes es que se debe de asegurar la esterilidad del medio de conservación, algunas veces la tierra es esterilizada por varias horas en autoclave o incluso se puede llevar a cabo en dos días sucesivos. La tierra es fraccionada en tubos de tapa de rosca y se coloca 1 mililitro de suspensión concentrada de microorganismos, los tubos inoculados son dejados destapados para lograr la evaporación del agua que contenía la suspensión, una vez que se completa la deshidratación de la muestra, se cierra el tubo y se conserva en refrigeración. (36,42)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Una de las desventajas de esta técnica a pesar de ser muy efectiva es que la tierra no es un producto estandarizado y consistente para su uso en largos periodos de tiempo, esto quiere decir que la composición de la tierra no está definida con exactitud y cuando se utilizan tierras que difieren en su procedencia puede variar de manera significativa en su composición. Se ha tratado de mejorar la técnica y tener mayor control del medio de conservación, para lograr este objetivo se ha sustituido la tierra por gel de sílice, la utilización de gel de sílice ha permitido tener mayor control sobre la composición del medio y ha dado un buen rendimiento para la conservación de hongos. Se han propuesto otros métodos de deshidratación uno de ellos es la utilización de papel filtro estéril como medio de conservación, se añade 1 ml de una suspensión bacteriana que contenga 10^8 microorganismos por mililitro, una vez inoculado el papel filtro se deja destapado el recipiente que contenga el papel filtro para que se pueda secar al aire o bien se puede secar aplicando vacío, una vez deshidratada la muestra es almacenada en refrigeración, se ha reportado que a través de esta técnica se han logrado conservar hasta por periodos cercanos a los cuatro años con buena recuperación. (35) (43)

Conservación en agua destilada

La gran mayoría de microorganismos no pueden sobrevivir en el agua destilada, pero algunos microorganismos como los hongos y bacterias del género *Pseudomonas*. Pueden sobrevivir bajo estas condiciones a temperatura ambiente por un periodo de tiempo de hasta doce años (44), es importante mencionar que se han reportado que esta técnica puede llegar a ser efectiva hasta un 93% para conservar hongos filamentosos que fácilmente esporulen, así como levaduras y actinomicetos aeróbicos, la mayor ventaja que tiene este método es que es de muy bajo costo.

(34,36,45)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Métodos de conservación a largo plazo

Los dos principales métodos de conservación a largo plazo, tanto la criopreservación y la liofilización son las técnicas más ampliamente utilizadas para la conservación de materiales biológicos, ambos protocolos permiten asegurar la conservación por periodos de tiempo prolongados manteniendo en un estado viable a los microorganismos. Ambos métodos han tomado un papel relevante dentro de las áreas médicas, así como en la industria farmacéutica, alimentaria y han penetrado en áreas como la agricultura. Pero su mayor utilidad y aplicación, donde se ha constatado todo su potencial es dentro de los biobancos, siendo las técnicas centrales para el desarrollo de estas instituciones. (34,36)

El mayor reto al cual se enfrentan estos métodos para que exista un mayor uso de ellos, es la gran inversión que es necesaria realizar para la adquisición de equipos, la optimización de espacios adecuados, pero sobre todo la capacitación de individuos que puedan desarrollarlos. La dificultad radica en el gran número de conceptos y técnicas que se deben de manejar para llevarse este tipo de protocolos. (46)

Tabla 0.6 Temperaturas importantes para conservación de cepas a largo plazo (46)

Rangos de temperatura encontrados en criobiología

35 °C	Temperatura de incubación bacteriana
20 a 22 °C	Temperatura ambiente
0 °C	Punto de congelación del agua
-21.8 °C	Temperatura eutéctica de Agua-NaCl
-35 a – 40 °C	Temperatura eutéctica de Agua- Crioprotector
-70 °C	Congelación profunda
-79 °C	Dióxido de carbono sólido
-88.7 °C	Temperatura ambiental más baja registrada
-139 °C	Límite para el crecimiento de cristales de hielo
-196 °C	Punto de ebullición del nitrógeno líquido
-213 °C	Punto de fusión de nitrógeno líquido

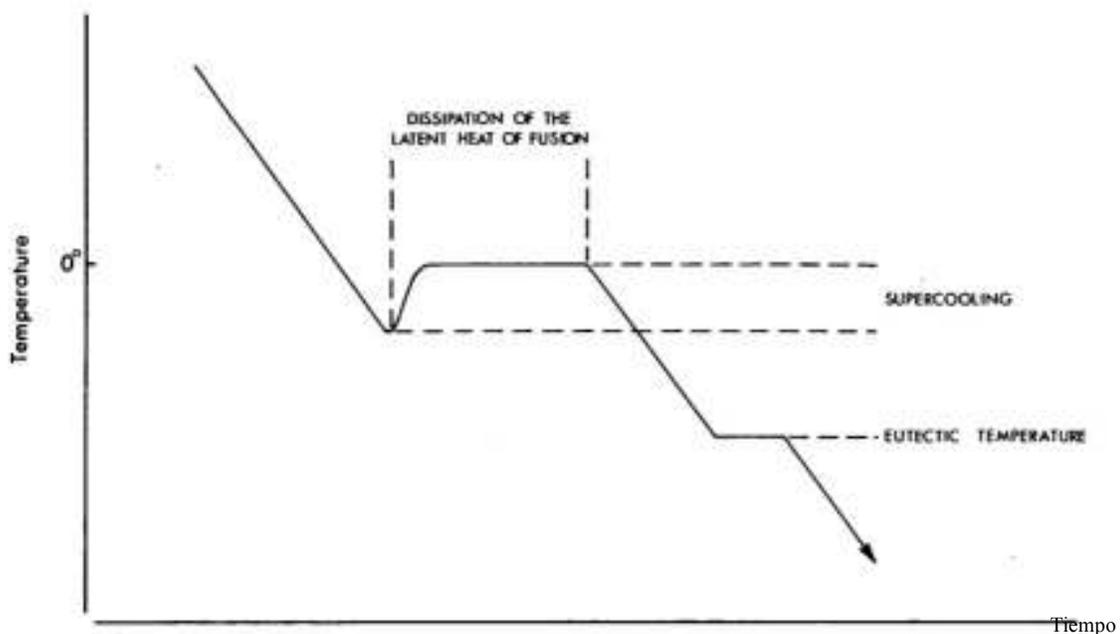
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

-273 °C

Cero absoluto

Crioconservación

Se puede definir como crioconservación a las técnicas que utilizan temperaturas muy bajas para preservar microorganismos y células vivas intactas a nivel estructural y funcional. Cuando se aplica un método de congelación desprotegido normalmente es letal para la entidad que quiere ser conservada, por lo tanto, las bajas temperaturas se deben de acompañar de condiciones estables para conservar y asegurar la vida de todo material biológico que quiera ser conservado. La crioconservación en si misma tiene dos problemas inherentes a la congelación misma del agua, la primera es la formación de cristales de hielo que se forma al interior de la célula. La formación de cristales hace que se perforen o dañen las membranas celulares de los microorganismos, el segundo problema es la concentración de solutos que son disueltos durante la fase líquida. La concentración de solutos tanto intracelular como extracelular determinará donde hay una mayor cantidad de agua residual, (a mayor cantidad de agua residual a nivel intracelular



mavor formación de cristales). (34 36 46 47)
Ilustración 8 Sistemas de congelación en una solución salina diluida que representa un sistema biológico

Daños por la congelación y uso de crioprotectores

Es importante comprender que muchos procesos y estructuras son dependientes de la temperatura, por consiguiente, el proceso de enfriamiento y congelación tiende a desencadenar efectos que son extraordinariamente complejos, el mismo proceso de enfriamiento produce condiciones que se alejan de las condiciones fisiológicas normales de un microorganismo, además, el agua es el componente principal de una bacteria, dependiendo de la especie puede llegar a representar desde el 50 hasta el 90 por ciento del peso total, para la mayoría de las especies de microorganismos el agua representa cerca del 70 por ciento del peso total. (47,48)

Cuando enfriamos un microorganismo por debajo de los 0 °C los eventos biológicos están dominados por la congelación del agua. El proceso de congelación es la conversión de agua líquida a hielo cristalino, el problema del proceso de congelación es que la formación de cristales de hielo se da primero en el medio extracelular, lo que va a provocar un aumento en la concentración de sales en el interior de la célula debido a la reducción de agua a través del proceso de formación de hielo, produciendo un fenómeno de desequilibrio osmótico, la formación de cristales de hielo en el medio extracelular provoca un desbalance osmótico y ocasionan que el agua que se encuentra intracelularmente salga por un proceso de ósmosis, el resultado final será evidenciado por la deshidratación de la célula provocando el estrés de la misma, la deshidratación puede generar el detrimento que puede evitar la posterior recuperación, además en el interior de la célula se lleva a cabo otro fenómeno, cuando el agua residual está altamente concentrada por cualquier soluto puede sobrepasar el límite de solubilidad, provocando la cristalización de cualquier soluto que éste presente en concentraciones mayores al límite, el fenómeno de cristalización y deshidratación son los dos procesos que más dañan a las células que quieren conservarse y son las dos razones principales de la pérdida de viabilidad. (48,49,50,51)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Para evitar el fenómeno de deshidratación y cristalización que ocurre con en el proceso de congelación se utilizan sustancias llamadas crioprotectores, el ejemplo más relevante y la primer sustancia que se ocupó como crioprotector fue el glicerol. Al agregar el glicerol a la suspección bacteriana, actúa aumentando la concentración del soluto en los sistemas extra e intracelulares, disminuye el punto de solidificación. Este crioprotector funciona como soluto, por lo cual el medio extracelular es un medio hipertónico compuesto por glicerol, lo que ocasiona que el agua que se encuentra dentro del sistema intracelular por medio de un fenómeno de ósmosis emigra hacía afuera de la célula y es sustituido por glicerol al interior de la célula, para que se lleve el intercambio entre el ambiente extra e intracelular, el crioprotector posee la propiedad de ser permeable a través de la membrana, la sustitución de agua por glicerol evita que se lleve acabo el fenomeno de deshidratación o hace que este fenómeno sea limitado, haciendo que disminuyedo el estrés para las células que se tratan de conservar. Otra de las propiedades del glicerol es impedir el aumento de la concentración, evitando la formación de hielo, esto quiere decir que la cantidad de agua residual (no congelada) es mayor, entre mayor sea la cantidad de agua residual será menor la concentración de iones y esto evitará la cristalización de los solutos. La disminución de la formación de hielo es lograda a través de la formación de una mezcla eutéctica (Agua-Glicerol), este tipo de mezclas tienen un punto de solidificación menor que la temperatura de solidificación que sus componentes por separado, provocando que la cantidad de agua residual sea mayor para disolver los solutos. (52,53)

Hay evidencia de un tercer mecanismo de protección que puede desempeñar el glicerol y es a través de la estabilidad de la membrana celular, el glicerol se une a través de enlaces hidrógeno con los grupos de la cabeza polar de los lípidos de membrana, este fenómeno es importante en los procesos de deshidratación de las cepas.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

¿Qué es un crioprotector?

Una sustancia química usada para proteger a las células durante un proceso de congelación y descongelación. (53)

Clasificación de crioprotectores

Los crioprotectores son aditivos utilizados en el almacenamiento de microorganismos, incluyen una gama amplia de compuestos simples y complejos, lamentablemente solo un poco de estos aditivos han sido usados extensamente, siendo aún menor la cantidad que han producido resultados satisfactorios. Entre los compuestos que han ofrecido mayor rendimiento para los procesos de crioconservación son la dimetilsulóxido, glicerol, albúmina, suero, leche descremada, peptona, extracto de levadura, sacarosa, glucosa, metanol, polivinilpirrolidona (PVP), sorbitol y extracto de levadura. Se tienen registros de los estudios que comparan la actividad crioprotector de los compuestos más utilizados en criomicrobiología, con base a cada uno de los reportes experimentales se puede concluir que los compuestos que tienen mayor actividad crioprotectora son compuestos como Me_2SO , metanol, etilenglicol, propilenglicol y la albúmina. (36,54)

Los compuestos que tienen una efectividad intermedia son glicerol, propilenglicol, polivinilpirrolidona y sucrosa, mientras que hay otros compuestos que tienen una actividad muy reducida, los compuestos que pertenecen a este grupo son los azúcares, dextran, hidroetil almidón sorbitol y leche descremada. (49,54)

Hay una gran cantidad factores que afectan la eficiencia de los crioprotectores y la crioconservación, por ejemplo, la especie, cierto tipo de cepas, el tamaño y forma celular, la fase del crecimiento en la que fue cosechada, la temperatura de incubación, composición del medio de cultivo y de conservación, pH, osmolaridad, contenido y composición de lípidos de la membrana celular, tasa de congelación,

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

temperatura de congelación y almacenamiento, tasa de descongelación así como el medio donde se realiza la recuperación de la cepa criopreservada. (46)

Los crioprotectores pueden ser divididos y clasificados de varias formas, la primera clasificación se realizó de acuerdo al peso molecular, aunque todos los compuestos se dividieron en dos grupos; los compuestos de bajo y alto peso molecular, años más tarde se adoptó una nueva clasificación de acuerdo a su tasa de permeabilidad y están divididos en dos grupos los que penetran la célula y los compuestos que no son capaces de penetrar la célula. (41)

Tabla 0.7 Clasificación de los crioprotectores (41)

Clasificación de acuerdo a su permeabilidad

<i>Permeables</i>	Permeabilidad rápida: metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, metilacetamida.
	Permeabilidad lenta: dimetilsulfóxido y glicerol.
<i>No permeables</i>	Mono, oligo y polisacáridos, manitol, sorbitol, dextrina, hidroxietilalmidón, metilcelulosa, albúmina, gelatina, otras proteínas, polivinilpirrolidona, polietilglicol.

Hoy en día los crioprotectores son clasificados de acuerdo a su estructura destacando grupos como los superóxidos, alcoholes monohidratados, dioles, trioles, polialcoles, amida, azúcares, compuestos complejos, surfactantes no iónicos, compuestos heterocíclicos, aminoácidos y proteínas. Algunos de los grupos tienen más de un compuesto que ha sido probado como crioprotector. (41)

Mecanismos de acción de los crioprotectores

La diferencia en la permeabilidad de los crioprotectores, a su vez afectará el mecanismo por el cual tendrá la capacidad de ejercer su efecto protector. Los agentes pueden dar protección por su capacidad de ser intracelulares o extracelulares. (54,55)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Crioprotectores intracelulares (Permeabilidad rápida)

Los crioprotectores que tienen una mayor eficiencia se caracterizan por ser altamente hidrofílicos, tener la capacidad de formar fuertes uniones con el agua por la presencia de grupos químicos. Los compuestos que son permeables hacen más plástica la membrana citoplasmática y se unen al agua que se encuentra dentro de la célula, esta acción previene el exceso de la deshidratación, reduce la toxicidad por sales y previene la formación de cristales grandes de hielo. En realidad muchos crioprotectores que penetran, estimulan la formación de pequeñas estructuras cristalinas de hielo y provocan la formación de una fase de hielo tipo gel por debajo del punto eutéctico. (41,49,55,56)

Crioprotectores intracelulares (Permeabilidad reducida)

La mayoría de estos compuestos, inducen su protección a través de la deshidratación parcial, antes de la etapa de congelación. Este tipo de compuestos tienen la propiedad de poder concentrarse entre las dos membranas de los microorganismos Gramnegativos o bien entre la membrana plasmática y la pared celular en el caso de los microorganismos gram positivos, la presencia de estos compuestos entre las dos capas celulares funcionan como un amortiguador contra la capa creciente de hielo proveniente del exterior. (49,55)

Crioprotectores extracelulares (No permeables)

Los compuestos que son incapaces de penetrar la célula, presentan uno de los mecanismos más interesantes e importantes, estos compuestos son **adsorbidos** en la superficie externa celular (membrana celular o pared celular), la adsorción de muchas moléculas del crioprotector terminará formando una capa viscosa que recubrirá toda la superficie celular, además aumentará la concentración de solutos extracelular permitiendo la salida parcial del agua intracelular por un proceso de

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

ósmosis, aumentará la viscosidad de la solución provocando una menor formación de hielo y la capa de crioprotector funcionará como un escudo que no permitirá el contacto del hielo extracelular con la célula. (54,55)

Combinación de crioprotectores

La combinación de crioprotectores ha permitido conservar una cantidad mayor de especies, varios estudios sugieren que la combinación puede producir una relación sinérgica entre los compuestos, por lo tanto aumentará eficiencia en el proceso de crioconservación, la mayoría de las combinaciones exitosas han utilizado un compuesto permeable y un compuesto que sea adsorbido por la membrana, se han probado gran variedad de mezclas de crioprotectores. El número de compuestos presentes en cada combinación puede variar, pero la gran mayoría de las investigaciones se han enfocado a los sistemas de dos y tres componentes. (54,55)

Características de un crioprotector

1. El compuesto debe de tener una alta solubilidad en agua y permanecer así a bajas temperaturas, para producir una disminución en el punto de congelación.
2. Debe de tener la capacidad de penetrar en las células.
3. Tener una baja toxicidad, para poder utilizarse a altas concentraciones. (49,52)

Efectos del cambio de la temperatura

A través de los años se ha logrado comprender los factores que afectan la calidad de un método de crioconservación, pero dentro de los parámetros realmente importantes a controlar están la velocidad de enfriamiento y calentamiento, estos dos parámetros a considerar son importantes determinantes de la viabilidad, la tasa de cambio de temperatura es importante porque controla el transporte de agua a través de la membrana celular, por lo tanto, indirectamente se puede controlar la probabilidad de la formación de hielo cristalizado en el espacio intracelular. La

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

congelación intracelular normalmente es letal, la velocidad de enfriamiento controla la velocidad en la que el agua es convertida en hielo, al controlar la producción de hielo también se puede llegar a controlar de manera indirecta el cambio de la concentración de la solución que rodea a las células, esto afecta de igual manera la osmolaridad del líquido circundante. (46,49)

El control de la velocidad de cambio de temperatura también influye en el transporte del agua intracelular durante el enfriamiento o el calentamiento. La cantidad exacta de agua intracelular puede proporcionar un equilibrio termodinámico a través de la membrana celular, provocando que el citoplasma no se congele (no llegará a estar por debajo de su punto de congelación), pero que todo el ambiente extracelular se encuentre congelado. (46,49,52)

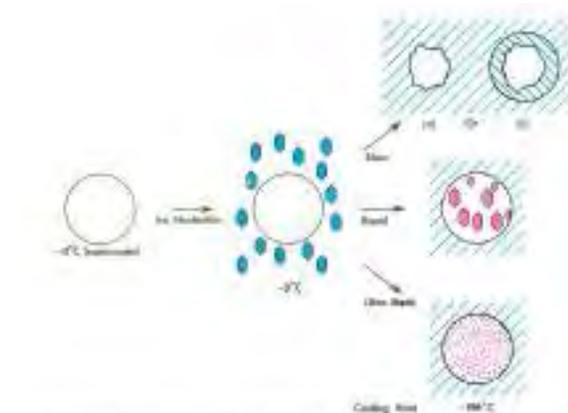


Ilustración 9 Representación gráfica de los efectos a diferentes tasas de congelación de las células

Cuando la velocidad de enfriamiento es demasiado rápida, impedirá que la membrana de la célula pueda transportar la cantidad suficiente de agua al ambiente extracelular. La disponibilidad excesiva de agua provocará el super enfriamiento del espacio intracelular provocando la formación de cristales que dañarán las células disminuyendo la probabilidad de recuperación. Es importante mencionar que se deben de evitar los cambios de ciclos de enfriamiento y calentamiento, aunque las condiciones primarias sean adecuadas para la conservación, el daño celular

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

acumulativo, a mayor número de ciclos de enfriamiento y calentamiento se obtendrán células con mayor deterioro. (46,49,50)

La mayoría de los microorganismos tienen un rango óptimo en la tasa de enfriamiento y es uniforme cuando se utiliza un sólo crioprotector. El rango de la tasa de enfriamiento que se ha optimizado es de 1 a 10 °C por minuto, esto quiere decir que una suspensión compuesta de microorganismo y crioprotector debe de reducirse la temperatura lentamente, teniendo la posibilidad de ser desde 1 a 10 °C por minuto hasta alcanzar por lo menos la temperatura de -35 °C. El enfriamiento debe continuar por lo menos hasta -35 °C a este ritmo, estas tasas aseguran el equilibrio de agua tanto intra y extracelular, esta acción evita la concentración de solutos y su cristalización. La temperatura de -35 °C es un factor importante a considerar porque la mayoría de suspensiones acuosas (Agua-Crioprotector) tienen una temperatura eutéctica (es la temperatura a la cual todas las porciones de una suspensión acuosa entran a fase sólida), que se aproxima a los -40 °C. Cuando utilizamos una tasa de congelación adecuada aseguramos que se lleve a cabo el equilibrio de agua de manera adecuada, por lo tanto, cuando se alcanza la temperatura eutéctica y se empiecen a formar los primeros cristales, ya habrá un equilibrio que asegurará la no formación de cristales o la menor cantidad posible. Después de alcanzar la temperatura de -35 °C se puede aumentar la velocidad de congelación, la congelación puede empezar a ser rápida con una tasa de congelación de 50-100 °C por minuto o bien seguir con una congelación lenta hasta alcanzar por lo menos una temperatura de -70 °C, sin tener mayores daños a la célula. (46) (49) (52) (50)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

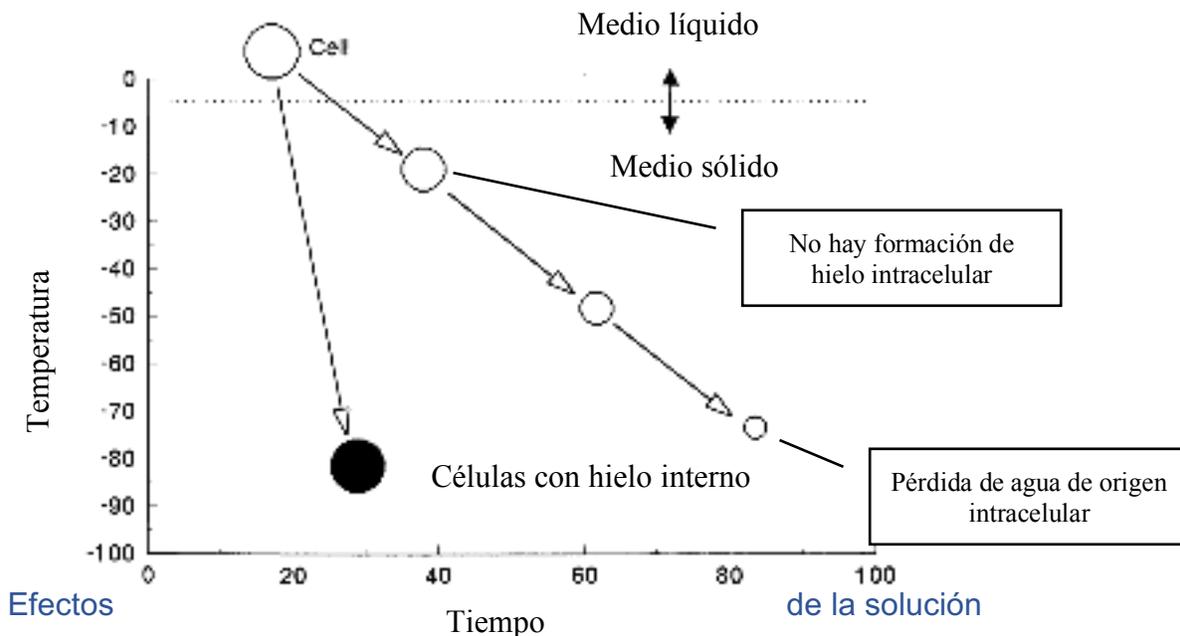


Ilustración 10 Representación esquema de células que son congeladas rápidamente que producen hielo interno y de células que son congeladas lentamente permitiendo la pérdida de agua para evitar la formación de hielo intracelular (46)

Aunque no se ha demostrado que los crioprotectores son totalmente inocuos, hay una teoría llamada efecto solución en donde el glicerol desarrolla un papel preponderante, cuando hay un proceso de congelación de una muestra sin crioprotector hay aumento en la concentración de los solutos (principalmente sales) por el mismo proceso, cuando esta misma muestra es descongelada las altas concentraciones hacen que ocurra la lisis de una fracción de las células conservadas, por lo tanto, hay una pérdida de viabilidad. En el caso de un solución que contiene glicerol también ocurre el aumento de la concentración de sales en el proceso de congelación, solo que es menor este aumento comparado con las soluciones que no tienen un crioprotector y en teoría debería de haber una disminución en la lisis cuando ocurriera un fenómeno de descongelación. Esto no es así cuando se utilizan altas concentraciones de crioprotector, la lisis celular aumenta, esto indica que cuando el crioprotector es utilizado a una concentración alta se comporta como soluto aumentando la concentración del sistema y a mayor concentración de crioprotector mayor es la lisis celular. Estas observaciones son importantes en primera porque muestra que los crioprotectores no son inocuos y

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

que un factor determinante en el uso de cualquier crioprotector es su concentración. (46,49,52,57)

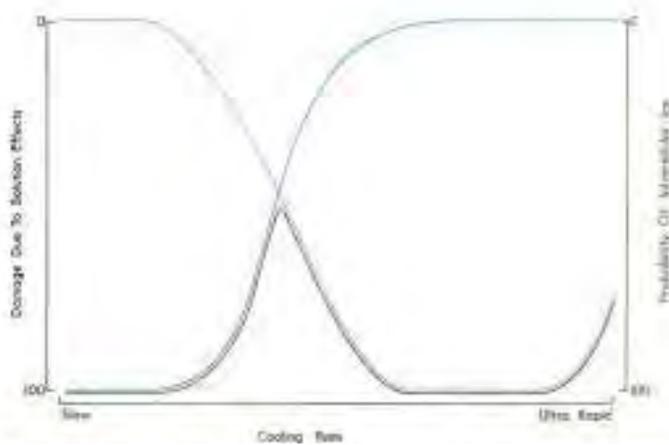


Ilustración 11 El daño provocado por el estrés del proceso de congelación. Línea Azul Muestra el efecto solución, la línea roja la formación de hielo intracelular.

Concentración celular

La mayoría de los estudios enfocados en los defectos provocados por el fenómeno de la congelación se han realizado con suspensiones de células muy diluidas. Cuando las células son empaquetadas densamente en un sistema de conservación sufren una mayor lisis, aunque los daños no pueden ser explicados a través de los efectos clásicos de lesiones por el proceso de congelación. La explicación más aceptada es que las células que son más densamente empaquetadas para su conservación, son mucho más propensas a ser dañadas por el estrés mecánico que finaliza con el bloqueo de los canales celulares por el cambio de la forma dentro de ellos. (36,49,54)

Tasas de descongelación

Las células tienen diferentes respuestas a diferentes tasas de descongelamiento, el proceso de descongelación es determinado por el método que se utilizó para la congelación. Cuando se eligen tasas de congelación lentas para la conservación de microorganismos y se alcanza temperaturas bajas, se llega a un estado donde las

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

células presentan un encogimiento, el proceso inverso se lleva a cabo al momento de un fenómeno de descongelación la célula es rehidratada. Este es un proceso que es independiente de la tasa de descongelación. Cuando se ocupan tasas de congelamiento rápidas, la probabilidad de formación de hielo intracelular aumenta, la formación de este tipo de hielo es termodinámicamente inestable y se produce la recrystalización, cuando se ocupan tasas de descongelamiento lentas va ocasionar un fenómeno de formación de cristales grandes dentro de la célula, la manera correcta de descongelar una solución que se ha crioconservado, es producir una descongelación rápida, para disminuir el tiempo para evitar el proceso de recrystalización. (36,46,49,52)

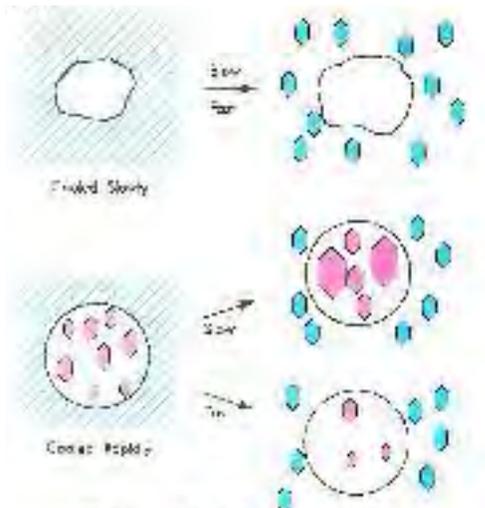


Ilustración 12 Diagrama representativo de los efectos producidos a diferentes tasas de descongelación

Edad Fisiológica de los microorganismos

La edad de cultivo puede tener un efecto profundo en la supervivencia bacteriana, los organismos que crecen en condiciones adecuadas de disponibilidad de nutrientes y que son cosechados en la fase estacionaria son los organismos que han demostrado ser células más resistentes, aunque cabe mencionar que la fase en que tienen que ser cosechados para su conservación también depende de la especie. La explicación del porqué la fase estacionaria es la mejor para conservar

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

las bacterias es muy simple, cuando un microorganismo llega a la fase estacionaria de crecimiento ya no hay nutrientes disponibles, lo que provoca varios estados fisiológicos que provocan una respuesta de estrés que está asociada a la supervivencia de la población celular, esta misma respuesta de supervivencia también le permite sobrevivir bajo otras condiciones adversas. (55,57,58)

Criopreservación por vitrificación

El proceso de vitrificación es un método alternativo de la criopreservación, esta técnica permite tener hidratadas las células al mismo tiempo que se encuentran congeladas a temperaturas criogénicas (-100°C) con ausencia en la formación de hielo. La vitrificación simplifica y aumenta la eficiencia de la criopreservación, porque evita los daños mecánicos ocasionados por el hielo, eliminando la necesidad de buscar la tasa óptima de congelación y de descongelación, este tipo de métodos descarta la formación de hielo intracelular, es tan rápido el proceso de congelación que puede esquivar el daño por el frío. Dentro de las desventajas que presenta esta técnica es que complica la ósmosis por la adición y eliminación de los agentes crioprotectores a demás de que presenta mayor toxicidad por parte de los crioprotectores. (46,49,52)

La vitrificación es la solidificación de una suspensión acuosa a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielos y es usualmente inducida por enfriamiento, pero nunca es congelada la solución, pero el enfriamiento usualmente aumenta la viscosidad aproximadamente a 10 P (Poise), momento en que el líquido ha entrado al estado vítreo o vítreo. La vitrificación tiene la habilidad de preservar moléculas, células, tejidos y organismos completos, logrando gran cantidad de aplicaciones actuales y futuras en áreas como son la agricultura, el área médica, en la ecología y en el campo científico. (46,49)

Temperatura de transición vítrea (T_G)

Es la temperatura a la cual dentro del proceso de vitrificación, hay una transición de un estado líquido a el estado vítreo, provocado por un proceso de enfriamiento. La T_G es una temperatura teórica alcanzada que por un proceso de congelación es

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

capaz de concentrar la parte líquida sin congelar de una solución hasta alcanzar su punto de fusión, provocando un aumento de su viscosidad, es importante mencionar que el hielo no puede seguir creciendo cuando se acerca a los valores de viscosidad que caracterizan a la transición vítrea. (49)

El propósito general del método de vitrificación es evitar los efectos del proceso de enfriamiento así como evitar los daños inherentes al proceso de congelación, en todo proceso de crioconservación la formación y disolución de cristales de hielo que se presenta tanto en los procesos de congelación como descongelación es inevitable, el hielo es casi completamente una sustancia pura. La formación del hielo resta agua que esta presente en el disolvente en una solución de congelación, este proceso generara que los solutos que aún están presentes se encuentren disueltos en un volumen mucho menor. (46,49,58)

Conservación de microorganismos por liofilización (freeze-drying)

La importancia del agua para cualquier entidad viva es fundamental, una de sus funciones principales es servir como solvente universal, además de apoyar las actividades bioquímicas dentro de la célula, sirviendo como plataforma para que se lleven acabo todos los procesos necesarios para la vida. La ausencia total del agua generalmente genera un estado de muerte, la ausencia parcial o reducida puede generar un estado de latencia en las células vivas que provocará la inhibición de la actividad bioquímica de las células y es el fundamento esencial para llevar acabo el proceso de liofilización. (35,53,59,60)

La liofilización surgió como un método para estabilizar productos lábiles, el proceso de liofilización se encarga de reducir la cantidad de agua contenida en las muestras que se quieren almacenar, aunque hay métodos que pueden estabilizar productos lábiles como son vacunas, así como otros materiales biológicos y microorganismos por medio de refrigeración o congelación, es importante resaltar que los productos estabilizados por medio de crioconservación tienen una gran desventaja al generar una gran costo por el mantenimiento y transporte de estos productos. Sobre todo es importante resaltar que el mal funcionamiento o la avería de un refrigerador,

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

congelador o sistema de enfriamiento puede provocar la pérdida total de un producto valioso que no puede ser remplazado. (47,58,60)

La liofilización es conocido también con el nombre de freeze-drying (deshidratación por congelación), la liofilización puede ser definida operacionalmente como un método controlable de deshidratación de productos lábiles por desecación al vacío.

Algunos de los conceptos de la liofilización se remontan a tiempos prehistoricos, ha sido aplicado a través de métodos rudimentarios de liofilización por las culturas como la azteca y los pueblos del Ártico con la finalidad de poder conservar productos alimenticios. La aplicación de este método en un laboratorio ocurrió en el año de 1880 pero durante este periodo solo se comprendió los principios básicos de la liofilización, fue hasta la década de 1930 cuando empezó a utilizarse con regularidad para el almacenamiento, así como para el procesamiento de los antibióticos y los productos sanguíneos termolábiles. (47,60)

Los procesos de liofilización no solamente han sido utilizados para conservar microorganismos, los productos que se pueden conservar por medio de la técnica de liofilización se clasifican de la siguiente forma:

- Productos no biológicos. Estos productos se deshidratan o concentran, en su mayoría son sustancias sensibles al calor. (60)
- Bioproductos no vivos, este grupo de productos constituye el mayor campo de aplicación incluyen enzimas, vitaminas, antibióticos, hormonas, productos sanguíneos y nanopartículas. Este grupo contiene un gran número de productos farmacéuticos que pueden ser utilizados para el diagnóstico o con una finalidad terapéutica. (47,59)
- Organismos vivos que componen vacunas o cultivo fuente, este grupo debe de tener la capacidad de crecer y multiplicarse, teniendo como máxima capacidad de reproducirse después del proceso de secado y reconstitución.

(61)

•

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

El proceso de liofilización puede dividirse en varios pasos que pueden resumirse en:

- Proceso de preparación de la muestra, serie de pasos que puede requerir una muestra para prepararla para el proceso de liofilización, ejemplos claros son la preparación de una vacuna, la extracción o purificación de un compuesto o bien la formulación de un medio adecuado para llevar acabo el proceso de liofilización (60)
- Congelación de la muestra, paso que durante el proceso reduce la desnaturalización térmica del producto a liofilizar, inmoviliza los componentes de la solución, evita la formación de vacío cuando es aplicado a la muestra, la formación de cristales facilita el proceso de secado. (59,60)
- Secado primario (sublimación), es la etapa donde los condiciones deben de mantenerse en la cámara de secado para poder sostener la migración del agua (hielo) durante el secado. A lo largo del secado primario la muestra se debe de mantener estrictamente por debajo del punto eutéctico o transición vítrea, esto ayudara a tener un menor daño en el proceso de secado.

La segunda etapa de secado es por la cual la humedad residente es eliminada mediante adsorción, es necesario este paso aunque aparentemente esté seco el producto.

- Sellado de la muestra seca, este proceso se lleva acabo con la finalidad de evitar la entrada de reactivos desestabilizadores, principalmente evitar la entrada de aire húmedo o bien la entrada de gases tales como oxígeno y dióxido de carbono. (59,60)

Las muestras deben de ser almacenadas evitando el contacto directo con la luz, los productos en esta etapa ya están listos para su uso. (47)

Los productos liofilizados deben de cumplir con las siguientes características para que sean productos de alta calidad.

Deben de ser mínimamente cambiados por el proceso de liofilización.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Deben de permanecer secos y activos.

Ser estables para las condiciones de almacenamiento.

Contar con un buen proceso de sellado para mantenerse limpios y estériles.

El producto debe de ser altamente soluble y simple para reconstituir.

Los productos que se liofilizan deben de ser económicamente viables

Factores que afectan el proceso de liofilización de los microorganismos (47,59,60)

Es de suma importancia señalar que se debe de minimizar el tiempo de exposición a la temperatura ambiente de la suspensión que contiene los microorganismos, para limitar los cambios en el tamaño de la población, otro de los factores a considerar es que se deben de mantener las bacterias bioquímicamente inactivas para evitar la formación de productos extracelulares que pueden dificultar el proceso de liofilización o de recuperación del mismo microorganismo, para lograr que estos fenómenos se presenten es necesario mantener la suspensión de bacterias a una temperatura entre 2 a 8 °C. (47,54,55)

La temperatura óptima que se debe de mantener durante el periodo de sublimación debe de ser por debajo del punto eutéctico de la suspensión. Para la mayoría de las suspensiones bacterianas la temperatura eutéctica generalmente es por arriba de los - 40 °C, esta temperatura es necesaria porque facilita realizar el proceso de deshidratación en un corto tiempo. (60)

Durante el proceso de liofilización se debe de mantener una temperatura diferencial de por lo menos de 20 °C entre el producto y el condensador, esta diferencia es requerida para asegurar una presión de vapor de por lo menos de 10 µm Hg. A lo largo del proceso de liofilización, se debe de mantener una presión de 50 µm Hg o menos. (59)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Varios sistemas cerrados pueden ser utilizados después de realizar la liofilización, para llevar el cerrado al vacío, bajo presión reducida. Cuando se cierra bajo condiciones de presión reducida o a presión atmosférica debe de ser relleno con un gas inerte diferente al oxígeno. ⁽⁵⁹⁾

Las cepas microbianas no pueden ser mezcladas en la operación de liofilización, solamente si se utilizan filtros separados para cada especie o de manera individual para cada muestra, la importancia de utilizar filtros es reducir la posibilidad de sufrir una contaminación cruzada durante el proceso de liofilización.

Cuando se almacenan cepas microbianas que han sido liofilizadas, se deben de conservar a una temperatura que no fluctue más de ± 10 °C, bajo condiciones libres de oxígeno, luz y humedad. Para obtener un máximo desempeño en la conservación de las cepas que han sido liofilizadas es necesario almacenarlas a una temperatura de 2 a 8 °C. ⁽⁶⁰⁾

Varios son los factores que pueden afectar la recuperación de las células durante y después del proceso de liofilización entre los más destacados son el tipo de células, edad de las mismas, condiciones de crecimiento, medio de suspensión, el mismo proceso de liofilización, temperatura de almacenamiento, humedad residual, integridad del contenedor y el método de reconstitución. ⁽⁵⁹⁾

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Tabla 8 Vida útil esperada de 33 géneros de bacterias preservadas por varios métodos ⁽⁴⁷⁾

Género	Transferencia Continua (meses)	Inmersión en parafina (años)	Ultracongelación (años)	Liofilización (años)
<i>Acetobacter</i>	1-2	1	>40	>40
<i>Achromobacter</i>	1	1-2	>40	>40
<i>Acinetobacter</i>	1 semana		>40	>40
<i>Actinobacillus</i>	1 semana	2-3	>40	>40
<i>Actinomyces</i>	1		>40	>40
<i>Agrobacterium</i>	1-2	1-2	>40	>40
<i>Arthrobacter</i>	1-2		>40	>40
<i>Bacillus</i>	2-12	1	>40	>40
<i>Bacteroides</i>	1 semana		>40	>40
<i>Bifidobacterium</i>	1 semana		>40	>40
<i>Chromatium</i>	1		>40	>5
<i>Clostridium</i>	6-12	1-2	>40	>40
<i>Corynebacterium</i>	1-2	1	>40	>40
<i>Enterobacter</i>	1-4	1-2	>40	>40
<i>Erwinia</i>	1-4	1-2	>40	>40
<i>Escherichia</i>	1-4	1-2	>40	>40
<i>Flavobacterium</i>	1	2	>40	>40

Género	Transferencia Continua (meses)	Inmersión en parafina (años)	Ultracongelación (años)	Liofilización (años)
<i>Gluconobacterium</i>	1		>40	>40

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

<i>Haemophilus</i>	1 semana	1 mes	>40	>40
<i>Klebsiella</i>	1-4	1	>40	>40
<i>Lactobacillus</i>	1 semana		>40	>40
<i>Methanobacterium</i>	1		>40	>5
<i>Methamonas</i>	1		>40	>5
<i>Micromonospora</i>	1		>40	>40
<i>Neisseria</i>	1		>40	>40
<i>Nocardia</i>	1-4	1	>40	>30
<i>Proteus</i>	1-2	1	>40	>40
<i>Pseudomonas</i>	1-3		>40	>40
<i>Spirillum</i>	1 semana		>40	
<i>Staphylococcus</i>	1-2		>40	>40
<i>Streptococcus</i>	1-2	1	>40	>40
<i>Streptomyces</i>	1-8	1-2	>40	>40
<i>Stenotrophomonas</i>			>40	>40

Métodos y esquemas generales de Conservación por congelación y resiembra continua



CAPÍTULO 7

Manejo de cepas de referencia

Una cepa de referencia es un microorganismo previamente determinado y debe de cumplir con los criterios de redimiento para pruebas particulares, las cepas de referencia tambien reciben otros nombres que se utilizan como sínonimos como son el caso de cepas control, cepas estándar o cepas de prueba.

A pesar de que el uso de cepas de referencia es ampliamente aplicado y aceptado, todavía hay algunas confusiones, el tema principal y el de mayor recurrencia es saber cuantos pases son aceptables para seguir considerando que las cepas siguen siendo cepas de referencia. (50,62)

Reducir el número de pases que sufre una cepa tiene como objetivo evitar la probabilidad que se contamine una cepa, entre mayor sea el manejo de una cepa de referencia aumenta la probabilidad de presentar una proceso de contaminación, otro de los factores es reducir o prevenir derivados genéticos o mutaciones, esto minimizará las variaciones genotípicas y fenotípicas. (63,64)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Aunque los parámetros en cuanto al número de pases que están permitidos realizar en una cepa ATCC difieren entre instituciones: la USP (United States Pharmacopeia) establece claramente que los microorganismos vivos que provengan de un cultivo de trabajo utilizadas para la prueba no deben tener más de cinco pases a partir del cultivo de referencia, mientras que la CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) recomienda que se pueden realizar hasta siete pases, un pase se utiliza para generar cultivos de reserva, se pueden seguir generando cultivos de reserva por tres pases adicionales, las cepas de trabajo también pueden tener tres pases adicionales para generar un total de siete pases a partir de una cepa ATCC de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI. ⁽⁶⁴⁾

Es importante señalar que las cepas ATCC normalmente son suministradas por el proveedor en una presentación donde el microorganismo se encuentra liofilizado y recibe el nombre de cultivo maestro, el microorganismo solo se debe reconstituir, una vez reconstituido se inocular en placas de agar o medio líquido adecuados para las exigencias de cada microorganismo, se incuban a las condiciones requeridas por cada especie, cuando ha transcurrido un periodo de incubación de 18-24 horas se procede a cosechar las cepas y son almacenadas en crioviales que contienen un medio adecuado para la crioconservación, estas muestras se les conoce como cultivos de reserva, es importante mencionar que deben ser almacenados a una temperatura de -80 °C. ⁽⁵⁰⁾

Ilustración 13 Esquema general de trabajo de una cepa ATCC

Los cultivos de reserva sirven para preparar los cultivos de trabajo, es importante señalar que los cultivos de trabajo son los que se utilizan a diario para realizar las pruebas de control o para verificar controles de calidad de los métodos empleados o medios de cultivo. Para generar un cultivo de trabajo es necesario realizar un pase de un cultivo de reserva a un medio sólido que permita el desarrollo del microorganismo, se debe verificar dos parámetros que son viabilidad y pureza, al cumplir con estos dos parámetros se procede a la siembra de los cultivos de trabajo, la mayoría de las veces los cultivos de trabajo son sembrados en tubos de

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

agar inclinado y por lo regular se siembran una serie de cuatro tubos que son almacenados en refrigeración (4 °C). (62)

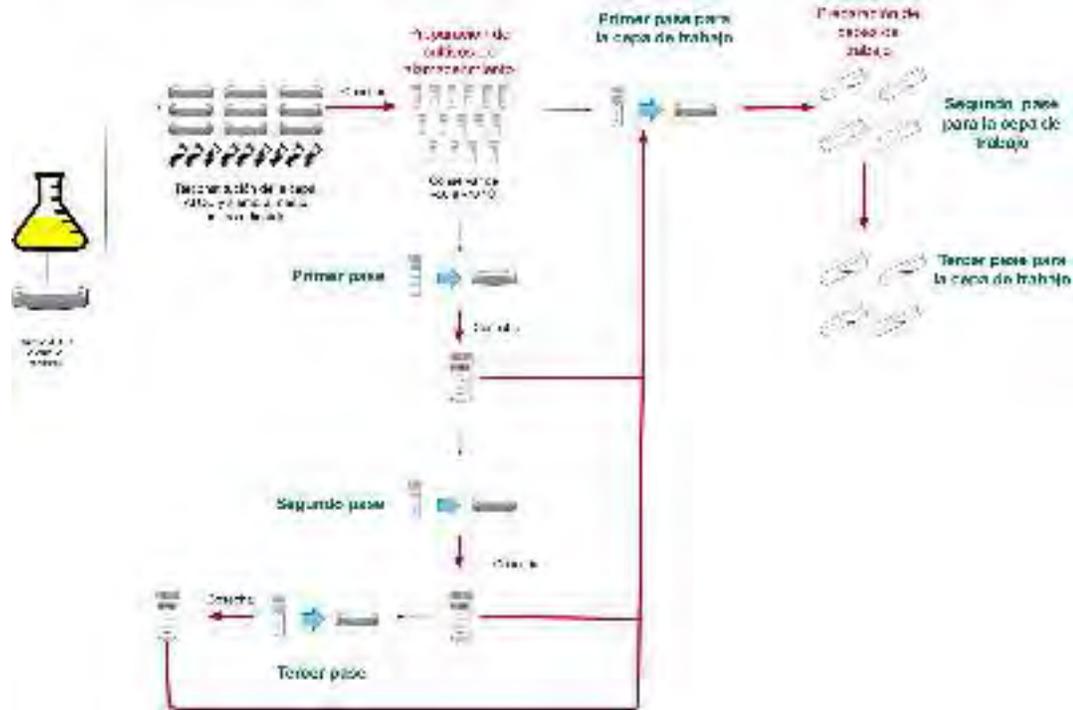


Ilustración 14 Sistema de generación de cepas stock y de trabajo

Control de calidad de cepas ATCC.

Verificación de pureza: Es el proceso donde se analiza tanto la morfología colonial, así como microscópica, el análisis a nivel macroscópico debe determinar si un cultivo es axénico, se debe de observar un buen desarrollo de la cepa, con una morfología colonial homogénea. Para el análisis microscópico se clasifica la cepa como gram positiva o gram negativa, poniendo atención en la morfología bacteriana, descartando una probable contaminación, cuando se obtiene el resultado del



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

análisis se debe de comparar con las características teóricas. En el caso de no concidir los datos del análisis y las características teóricas se procede a descartar la cepa. Es importante mencionar que el control de pureza se debe de realizar cuando se genera el cultivo maestro y los cultivos de trabajo. (34,53)

Identificación del cultivo

La correcta identificación y caracterización para la autenticación de las cepas microbianas, así como la confirmación de la identidad para los microorganismos que comúnmente utiliza un laboratorio se debe de realizar a nivel de género y especie, usando la mayoría de pruebas microbiológicas que tenga disponible el laboratorio para la identificación de la cepa. (34,53)

Identificación fenotípica

Características morfológicas: La caracterización de microorganismos inicia con la determinación de la morfología colonial y celular. La forma, tamaño así como el arreglo de la célula microbiana. Las técnicas de tinción son un requisito más para diferenciar los microorganismos e incluso hay tinciones específicas para resaltar alguna característica particular de un microorganismo. (17,34)

Reacciones bioquímicas- Es necesario que todos los microorganismos sean verificados a nivel de género y especie, la forma más sencilla de verificar la identidad de una cepa es a través de las diferencias metabólicas que exhibe cada especie, una de las pruebas que tiene mayor utilidad para diferenciar a los microorganismos es la capacidad que tienen para producir ácido y gas a partir de un carbohidrato como única fuente de energía (glucosa, lactosa, sucrosa, manitol, etc.). Otras pruebas bioquímicas que pueden ser utilizadas son las que determinan si el microorganismo es capaz de producir un producto en particular (por ejemplo indol,

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

peróxido de hidrógeno, etc), los microorganismos que poseen esta capacidad poseen una enzima en particular.



Ilustración 15 Identificación de *K pneumoniae*

Identificación genotípica- Este tipo de métodos han mostrado ser rápidos y sobre todo muy precisos comparado con los métodos fenotípicos. Los métodos genotípicos teóricamente son más confiables porque la secuencia de ácidos nucleicos son altamente conservados en muchas especies de microorganismos. Entre los métodos genotípicos más utilizados está la proporción de bases en el DNA (Contenido de G+C), hibridación DNA-DNA, secuenciación 16S o 23/ITS rRNA, huella genética, tipificación multilocus de secuencias y la pirosecuenciación. Es importante resaltar que estos métodos son técnicamente más desafiantes para el personal del laboratorio y se requiere contar con el personal calificado para el análisis de los datos, además la identificación a través de un método molecular es fundamental en el curso de una investigación, siendo las técnicas genéticas y serotípicas las más utilizadas para el desarrollo de una investigación seria. (17,34)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Método de resiembra continua

Material

Tubos de ensaye 13x100 mm con tapón de rosca

Agar Soya Trypticaseína

Asa Bacteriologica

Microorganismo

Mechero

Gradilla

Protocolo

- Preparar cuatro tubos de ensaye por cada cepa a conservar. Los tubos deben de contener 10 mL de Agar Soya Trypticaseína, la preparación del medio de cultivo se debe de realizar de acuerdo al fabricante.
- Esterilizar los tubos por calor húmedo a 121 °C a 15 lb/in² por 15-20 minutos.
- Dejar enfriar y solidificar el medio de cultivo, inclinando los tubos.
- Refrigerar a una temperatura 4-8 °C, los tubos de AST se pueden conservar por un periodo de 1 mes.
- Incubar la o las cepas que se quiera conservar entre 18-24 horas antes de llevar acabo el método, debe de ser en una caja petri en un medio no selectivo y de preferencia enriquecido.
- Tomar un juego de cuatro tubos de AST para cada cepa a conservar por el método de resiembra continua.
- Generar las etiquetas, deberá llevar el nombre (género y especie), número de cepa ATCC, el número de la cepa de trabajo el cual representa el número de resiembras que tiene la cepa (WT1, WT2, WT3) y la fecha en la que se realiza la inoculación del tubo.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

***Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6548**

WT1 20/05/2017

- Etiquetar los tubos de AST para cada una de las cepas que se desea conservar.
- Verificar que el cultivo que se colocó en incubación 18-24 horas antes, sea un cultivo puro, con morfología distintiva de la especie.
- Tomar una colonia e inocular los tubos de agar inclinado que contienen AST.
- Incubar los tubos inoculados por un periodo de 18-24 horas.
- Después de transcurrir las 24 horas de incubación se verifica de manera visual que no esté contaminado el tubo.
- Una vez que se determine que cada cepa está libre de contaminación se coloca en una gradilla.
- Los tubos son almacenados en refrigeración (4-8 °C).
- El tiempo aproximado de viabilidad de las bacterias será aproximadamente de 3 meses.
- En caso de no ocupar las cepas de trabajo, se debe de realizar el control de viabilidad una vez al mes con la finalidad de verificar que se encuentren viables cada una de las cepas.

Método de crioconservación con Leche Descremada y Glicerol

Material

20 gramos de Leche Descremada

20 mililitros de Glicerol

100 mililitros de Agua

2.2 gramos de caldo Mueller Hinton (CMH)

Asa bacteriológica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Cajas de Agar chocolate

Cepas ATCC o cualquier otra cepa

Crioviales

Preparación de la solución Leche-Glicerol-CMH

- En una matraz de 500 ml colocar los 2.2 gramos de Caldo Mueller Hinton y los 20 gramos de Leche descremada.
- Medir 20 mililitros de glicerol y agregarle 100 mililitros de agua destilada, mezclar los líquidos hasta que se vea una mezcla homogénea.
- Añadir la mezcla Agua-Glicerol al 20% lentamente al matraz que contiene el Caldo Mueller-Hinton, mientras se vierte el líquido, evitando la formación de burbujas.
- Mezclar perfectamente, no se debe de observar partículas.
- Dividir la mezcla en recipientes (tapa de rosca) que contengan no más de 25 mililitros.
- Esterilizar la mezcla de leche descremada-glicerol-CMH por calor húmedo, se puede esterilizar a una presión de 15 lb/in² para alcanzar una temperatura de 121 °C pero solo debe ser por 8 minutos, o bien puede ser a 10 lb por 15 minutos. Vigilar que el proceso de desnaturalización de la leche no se presente durante el proceso esterilización.
- Realizar el control de calidad microbiológico a la mezcla esteril (Leche descremada-glicerol-CMH), colocando 100 µL de leche en agar chocolate y estriar de manera que cubra toda la caja. Incubar la caja por 24 horas, no debe presentarse aparición de crecimiento bacteriano, si es así la leche está lista para ser utilizada para cosechar cepas.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Siembra de cepas ATCC o de cualquier cepa que se quiera almacenar.

- Abrir el paquete que contiene la cepa ATCC.
- Extraer el recipiente que contiene el material biológico.
- Retirar de recipiente la etiqueta de identificación de la cepa ATCC y colocarla en la bitácora de control de calidad.
- Aplicar presión en la parte superior de la ampolleta que contiene la cepa ATCC con la finalidad que el líquido hidratante entre en contacto con la porción liofilizada del material biológico.
- Mantener en posición vertical por aproximadamente dos minutos, aplicando presión en la parte superior dos o tres veces, con la finalidad de asegurarse que todo el líquido de hidratación entre en contacto con el material liofilizado.
- Homogenizar la muestra del líquido hidratante con el liofilizado aplicando presión en la parte inferior de la ampolleta se caracteriza por tener un hisopo en la parte inferior.
- Inmediatamente abrir la ampolleta, verificar que el hisopo esté completamente impregnado.
- Sembrar cajas de agar chocolate de manera masiva hasta agotar el contenido de la ampolleta (normalmente son aproximadamente 20 cajas por ampolleta).
- Incubar las cajas a la temperatura adecuada para cada microorganismo por 24 horas (normalmente es a 37 °C).

Cosecha de cepas ATCC

Utilizar cepas en fase estacional que tengan 18-24 horas de incubación en agar chocolate.

Verificar que no tengan ningún tipo de contaminación.

Utilizar crioviales previamente esterilizados con una capacidad de 2 mL.

Etiquitar los crioviales con el nombre, número de cepa , fecha de cosecha.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Añadir 1.5 mL de la mezcla Leche descremada-Glicerol-CMH de manera aséptica a cada criovial.

Cosechar con un asa bacteriológica el crecimiento bacteriano y depositarlo en el criovial de manera aséptica, para los microorganismos gram negativos y gram positivos que no son exigentes en su crecimiento se puede lograr cosechar tres crioviales de cada caja de crecimiento.

Tapar el criovial y mezclar de manera vigorosa, con la finalidad de tener un suspensión homogénea de la mezcla, ayudarse con un vortex en el mezclado.

Colocar los viales en un criocaja, que este etiquetada correctamente.

Una vez cosechado cada criovial, colocar los viales en un ultracongelador (temperatura de -80 °C).

Realizar control de calidad de crecimiento cada 4 meses si no se ocupan la cepas frecuentemente.

Siembra de cepas guardadas por ultracongelación

Extraer del ultracongelador el criovial o crioviales que son necesarios sembrar (no más de cuatro a la vez).

Etiquetar las cajas de agar (agar chocolate o agar sangre) que se desean sembrar con el nombre, número de cepa y fecha.

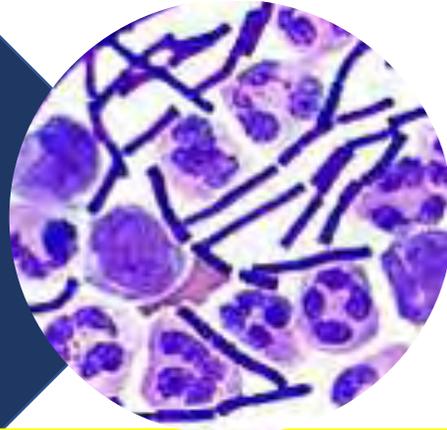
Con un asa bacteriológica al rojo vivo extraer un fracción del material congelado del criovial y depositarlo en medio de cultivo.

Sembrar por estría cruzada para verificar pureza.

Incubar por 18-24 horas.

Con estas cajas se pueden generar los cultivos de trabajo.

Fichas de
identificación y
conservación
bacteriana.



CAPÍTULO 8

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach ATCC ® 6538™
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach ATCC ® 12600

Descripción de morfología macroscópica

Colonias elevadas, brillantes, lisas, con márgenes enteros, la pigmentación puede variar desde gris, amarillo, anaranjado, el diametro de la colonia es ≥ 5 mm, crecen bien en un rango de temperatura de 10-45 °C, la mayoría de las cepas produce β -hemólisis, pero la temperatura óptima de crecimiento para las cepas de *Staphylococcus aureus* es 30-37 °C, tienen un mejor desarrollo en condiciones anaerobias y crecen bien en medios de cultivo que contienen 10% de NaCl. ^(65,66)

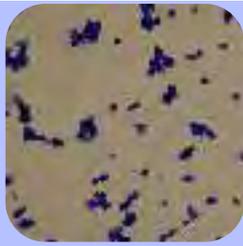


ASC 5%



β -hemólisis

Descripción de morfología microscópica



Cocos grampositivos, no formadores de esporas, se pueden encontrar en una disposición individual, pares o racimos de uvas, es una cepa anaerobia facultativa, tienen un diámetro de 0.5-1µm. Algunas cepas pueden ser capsuladas. (65,66)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede desempeñar un rol como comensal o patógeno humano. Se estima que aproximadamente el 30% de la población humana está colonizada con *S. aureus*. (67) (68)

Como agente patógeno es una de las principales causas de bacteremia y endocarditis infecciosa, así como infecciones osteoarticulares, piel y tejidos blandos, pleuropulmonar e infecciones relacionadas con dispositivos, meningitis y neumonía, también se caracteriza por provocar infecciones mediadas por toxinas como los son la escarlatina, el síndrome de la piel escaldada estafilocócica y el síndrome de sock tóxico.

El impacto de las infecciones de *S. aureus* se ve reforzado por el desarrollo de resistencia a los antibióticos especialmente de las cepas *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), este tipo de cepas son resistente a prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos, es muy importante diferenciar las cepas de *S. aureus*



Ilustración 16 Absceso (67)



Ilustración 17 Celulitis que rodea una pústula (67)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

meticilino resistentes que son de origen hospitalario y los que son adquiridos en la comunidad ya que sus patrones de resistencia son muy diferentes, las cepas aisladas de origen hospitalario además de ser resistentes a los β -lactámicos, son resistentes a grupos de antibióticos como los macrolidos-licosamidas-esteprograminas, espectinomina y rifampicina (67,68,69)

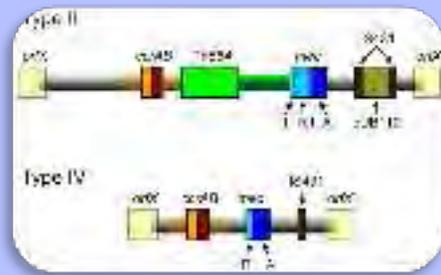


Ilustración 18 Cassete que confiere resistencia a meticilina de origen intrahospitalaria (Type II), y cepas MRSA adquiridas en la comunidad (Type IV)

Pruebas de identificación (66) (70)

Catalasa +		Producción de ácido a partir de manitol	
Coagulasa +			

Factores de virulencia (67,68)

- I. Polisacáridos capsulares
- II. Peptidoglucano y ácidos teicocicos.
- III. Proteína de unión a fibronectina A
- IV. Proteína de unión a fibrinógeno
- V. Proteína A
- VI. Hemolisinas
- VII. Panton-Valentine leucocidina

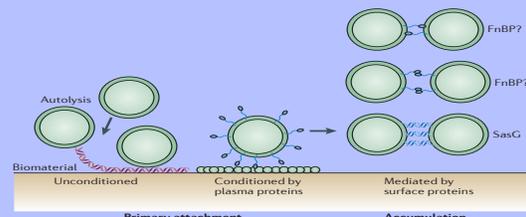


Ilustración 19 Formación de biofilm a través de diversos factores de virulencia (189)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

VIII. Toxinas exfoliatinas

IX. Enterotoxina A-E, H e I

X. Enterotoxinas estafilocócicas (síndrome de shock tóxico).

XI. Biofilm

Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (cinco años) Resiembra continua. (tres meses)	Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservacion y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5%, AST, Agar chocolate.
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Staphylococcus epidermidis ATCC® 14990

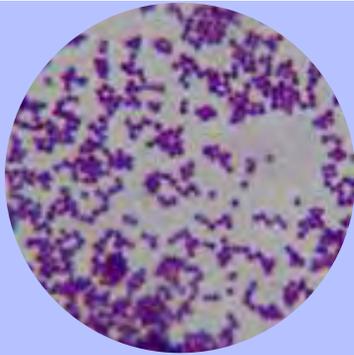
Descripción de morfología macroscópica

Colonias generalmente no pigmentadas (gris o blanco grisáceo), lisas, elevadas, brillantes, con bordes enteros. Pueden ser mucoides o viscosa, pueden ser pegajosas de acuerdo a la edad del cultivo. Los diámetros de la colonia pueden ir desde 2.5 mm hasta 4.0 mm de borde a borde. Es anaerobio facultativo pero su desarrollo es mejor en condiciones aerobicas. Crece de manera satisfactoria en medios de cultivos que tienen una concentracion de 7.5 % de NaCl, tiene un rango en su temperatura de crecimiento que oscila entre 15-45 °C pero su rango óptimo de temperatura es de 30-37 °C. (65,66)



ASC 5%

Descripción de morfología microscópica



Staphylococcus epidermidis es un coco grampositivo, no formador de esporas, posee un diámetro aproximado de 0.8-1 μm de diámetro se puede encontrar agrupado en pares y tetradas y ocasionalmente puede presentarse de manera individual. (65,66)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Staphylococcus epidermidis es un *Staphylococcus* cuagulasa negativo, que es parte normal de la microbiota de piel y mucosas de los humanos así como de otros mamíferos. A pesar de ser un organismo saprófito algunas veces puede comportarse como un microorganismo oportunista, además desempeña un papel importante en el equilibrio de la microbiota epitelial evitando la colonización de otros microorganismos. Sin embargo hoy en día esta especie es considerada uno de los

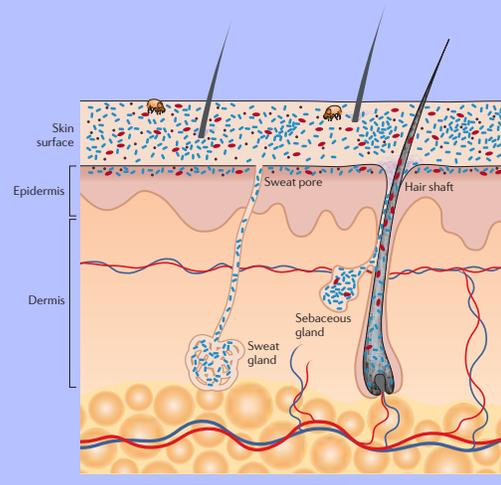


Ilustración 20 Composición de la microbiota de la piel

microorganismos que provocan con mayor frecuencia infecciones de origen nosocomial y se encuentra relacionado principalmente con infecciones de prótesis articulares, infecciones de catéteres centrales o periféricos, injerto vascular, infecciones del sistema nervioso central y dispositivos cardíacos. (71,72)

Las infecciones por *S. epidermidis* representan aproximadamente el 22% de todas las infecciones del torrente sanguíneo. (73)

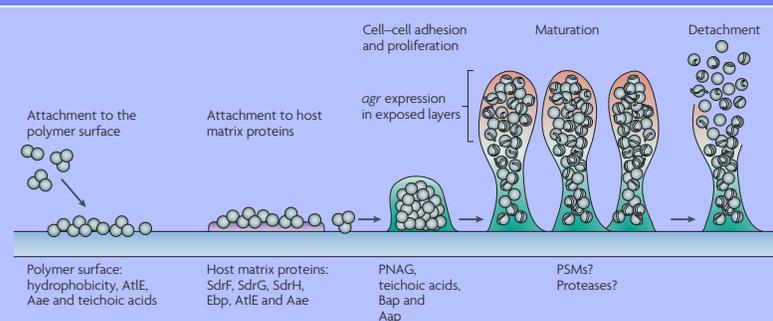
La capacidad de *S. epidermidis* de desarrollar biofilms es un factor de virulencia crucial para adherirse a superficies vivas e inertes. (71,73)

Pruebas de identificación (66,70)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Catalasa +		Producción de ácido a partir	
Coagulasa -		Manitol -	
		Trehalosa -	
			

Factores de virulencia



Desarrollo de biofilms

Ilustración 21 Etapas de formación de un biofilm

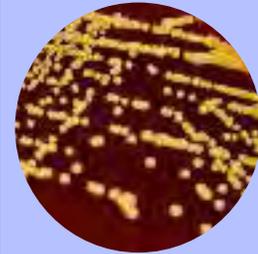
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (cinco años) Resiembra continua (tres años)	Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continua.	ASC 5%, AST, Agar chocolate.
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Micrococcus luteus (*lysodeikticus*) ATCC® 4698

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *M. luteus* son lisas, convexas con un borde regular y mate. Las colonias pueden ser amarillas, amarillas verdosas o pigmentadas en color naranjas normalmente en tonos mate e incluso algunas cepas pueden llegar a producir un pigmento color violeta difusible en el medio de cultivo. Es un organismo aerobio, el rango óptimo para la temperatura de crecimiento es 25-35 °C, el crecimiento es pobre en presencia de concentraciones de 10% de NaCl. (66,74,75,76)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



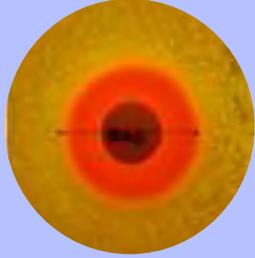
Son células grampositivas, no móviles, no formadores de esporas, se agrupan en tetradas o de forma irregular (66,74,76)

Epidemiología y aspectos clínicos.

M. luteus es un microorganismo que tiene muy pocos reportes que lo relacionen como agente causal de alguna infección en seres humanos, pero en algunos casos puede ser considerado como un agente oportunista, algunas cepas de esta especie han sido aislados como agente causal shock séptico, meningitis, artritis séptica, endocarditis y como agente causal de infecciones relacionada a catéter, pacientes que reciben diálisis peritoneal. Los casos que se han reportado son muy pocos y debe de haber evidencia certera para tomar en cuenta a *M. luteus* como patógeno. (74,75,77)

Pruebas de identificación (66,70,75)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

<p>Catalasa +</p> <p>Oxidasa +</p>		<p>Sensibilidad a la Bacitracina</p>	
<p>Métodos de conservación</p>		<p>Medio de conservación</p>	
<p>Crioconservación (cinco años)</p> <p>Resiembra continúa (tres meses)</p>		<p>Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).</p>	
<p>Temperatura de conservación</p>		<p>Medio de propagación</p>	
<p>-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.</p>		<p>ASC 5%, AST, Agar chocolate.</p>	
<p>Temperatura de incubación</p>		<p>Tiempo de incubación</p>	
<p>30 °C</p>		<p>18-24 horas</p>	

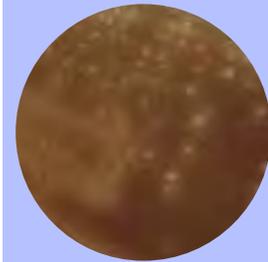
Streptococcus pyogenes ATCC® 12344

Descripción de morfología macroscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

S. pyogenes crece bien en agar sangre de carnero tienen aproximadamente un tamaño de 0.5 mm y se caracteriza por presentar β -hemólisis, por lo general la zona de hemólisis puede llegar a ser dos o tres veces mas grande que el diámetro de la colonia, se han descrito hasta tres diferentes tipos de morfología colonial para este microorganismo, las colonias pueden ser mucoides, mate (colonias mucoides deshidratadas) o lustrosas, el tipo de morfología que desarrollo es dependiente a la cantidad de ácido hialurónico que produce y las condiciones de crecimiento. El temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y mejora cuando el medio de cultivo se le añade sangre o suero.

(78,79,80)



ASC5%



β -hemólisis

Descripción de morfología microscópica



Es una bacteria grampositiva, con forma de esferas (cocos) que tienen un diámetro de 0.5-1.0 μ m, normalmente crece en cadenas cortas o largas por lo regular estan formadas por 4 o incluso hasta 10 células, los cultivos que provienen de un medio líquido o muestras clínicas presentan agrupación en cadenas, cuando la bacteria crece en un medio sólido se encuentra agrupadas las células en pares. (78,79,80)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Infecciones supurativas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Dentro de estas infecciones que son asociadas a *S. pyogenes* están la faringitis, en algunos casos la faringitis puede complicarse con la aparición de un exantema difuso (escarlatina). Puede producir infecciones de piel (pioderma, celulitis, erisipela, impétigo, fascitis necrozante), septicemia puerperal, linfangitis, neumonía y el síndrome de shock tóxico estreptocócico. (80,81)



Ilustración 22 Faringitis

Infecciones no supurativas

Fiebre reumática y glomerulonefritis aguda

Pruebas de Identificación (70,79,80)

Catalasa –		Prueba de sensibilidad a la bacitracina Sensible	
------------	--	--	--

Factores de virulencia (79,81)

Capsula de ácido hialurónico

Estreptolisina O y S

Toxina pirogénica

Hialuronidasa

Estreptoquinasa

Métodos de conservación

Medio de conservación

Crioconservación (cinco años)

Caldo Soya tripticaseína + Leche

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Resiembra continua (tres meses)	descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continua.	ASC 5%, AST.
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
30 °C	18-24 horas

Streptococcus agalactiae ATCC® 13813

Descripción de morfología macroscópica

S. agalactiae constituye el grupo B de la clasificación de Lancefield, presenta un crecimiento rápido en agar sangre de carnero y exhibe varios tipos de hemólisis generalmente β -hemólisis, pero también puede producir una doble zona de α -hemólisis e incluso no presentar hemólisis en algunas cepas este tipo de cepas puede llegar a representar el 11% de todas las cepas aisladas. La mayoría de las colonias crecen en agar sangre, llegan a tener un diámetro de 2mm, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. Exhibe buen crecimiento en un periodo de incubación de 24 horas, es importante resaltar que algunas cepas pueden producir pigmento color amarillo, anaranjado o color rojo ladrillo.

(78,79,80)



ASC 5%



β -hemólisis

Descripción de morfología microscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



Streptococcus agalactiae es una bacteria esférica, que mide 0.6-1.2 μ m de diámetro, en medio líquido se agrupan en cadenas muy largas y es muy raro encontrar cadenas menores de cuatro células. (78,79,80)

Epidemiología y aspectos clínicos.

La importancia de *S. agalactiae* agente causal de la sepsis neonatal, pero también puede producir enfermedades invasivas, como son bacteremia o meningitis.

Las infecciones neonatales son divididas de inicio temprano y tardío, las infecciones de inicio

temprano aparecen dentro de los primeros siete días de vida, mientras que las infecciones de inicio tardío normalmente aparecen antes de los tres meses de vida de los bebés.

Entre las mujeres embarazadas, la infección oscila entre infección urinaria leve, amnionitis y endometritis incluso puede llegar a provocar sepsis o meningitis. (82)

Se puede aislar de heridas, celulitis, fascitis, endocarditis y osteomielitis. En el caso de niños y recién nacidos puede llegar a causar sepsis, neumonía, meningitis y hasta algunas ocasiones puede llegar a provocar pielonefritis. (83,84)

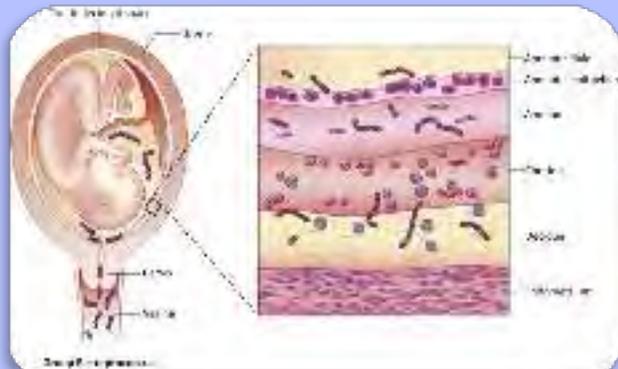


Ilustración 23 transmisión madre-hijo de *Streptococcus agalactiae* (82)

Pruebas de identificación. (70,79,80)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

<p>Catalasa –</p> <p>Prueba de sensibilidad a la bacitracina</p> <p>Resistente</p>		<p>Reacción de</p> <p>CAMP +</p>	 <p>Punta de flecha</p> <p>Factor CAMP</p> <p>Positivo</p>
---	---	----------------------------------	---

Factores de virulencia (84) (79)

Polisacárido capsular

C5a Peptidasa

Secreción de enzimas hialurinasasa

Métodos de conservación

Medio de conservación

Crioconservación (cinco años)

Resiembra continua (tres meses)

Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Temperatura de conservación

Medio de propagación

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C

Resiembra continua.

ASC 5% y AST

Temperatura de incubación

Tiempo de incubación

37 °C

18-24 horas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Streptococcus mutans ATCC® 25175

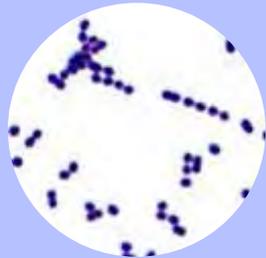
Descripción de morfología macroscópica

Streptococcus mutans crece bien en agar sangre después de un periodo de incubación de un día pero algunas cepas pueden requerir de dos días de incubación, las colonias pueden ser blancas o grises, presentan una forma circular o pueden ser irregulares, el tamaño de la colonia puede oscilar entre 0.5-1 mm de diámetro, en algunas ocasiones las colonias son duras y tienden adherirse a la superficie del agar, la mayoría de las cepas producen α -hemólisis o no producen ningún tipo de hemólisis y son poco comunes observar cepas que tengan la capacidad de producir β -hemólisis. (78,79,80)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



Streptococcus mutans es una bacteria gram positiva, las células presentan una forma cocoide, tienen un diámetro aproximado de 0.5-0.75 μ m y pueden estar agrupadas en pares, en cadenas cortas o en cadenas de longitud media sin producción de cápsula. En condiciones ácidas tanto en medio líquido y así como medios sólidos pueden formar pequeños bacilos (1.5-3 μ m de longitud), la morfología bacilar es muy común que se presente de aislamientos primarios provenientes de muestras orales. (78,79,80)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Streptococcus mutans es el principal microorganismo productor de caries dentales, la capacidad de ser un organismo cariogénico está asociado con su capacidad para metabolizar diferentes azúcares, formar biopelículas, producir grandes cantidades de ácido láctico pero sobre todo tener la capacidad de sobrevivir y prosperar en un medio ácido. (85)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Son uno de los principales agentes causales de endocarditis bacteriana e incluso algunas veces puede causar neumonía y meningitis en pacientes inmunocomprometidos. (86)

Pruebas de identificación (70,87)

Catalasa –		Fermentación	
Voges-Proskauer +		Sorbitol +	
Esculina +		Lactosa +	
		Rafinosa +	
		Trehalosa +	

Factores de virulencia (79,85)

Formación de biopelículas
 Proteínas vinculantes a glucanos
 Hemolisina secretora de proteasa

Proteína con afinidad a PsaA
 Enzima glucosiltransferasa

Métodos de conservación

Medio de conservación

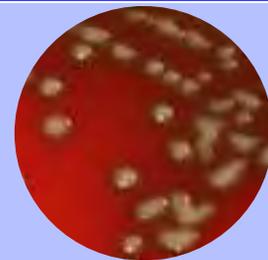
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Crioconservación (cinco años) Resiembra continua (tres meses)	Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Streptococcus pneumoniae ATCC® 6333 colonias lisas
Streptococcus pneumoniae ATCC® 49619 colonias rugosas

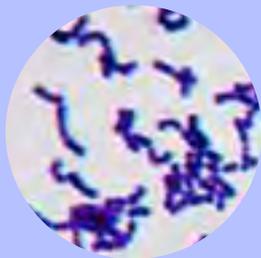
Descripción de morfología macroscópica

Streptococcus pneumoniae produce α -hemólisis cuando es incubada en agar sangre en condiciones aerobias, puede haber hasta tres tipos de variantes morfológicas en esta especie, hay cepas que pueden ser mucosas, lisas o rugosas. Es importante mencionar que la variante que tiene mayor frecuencia en el aislamiento son las cepas mucosas. (78,79,80)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



Son células ovaladas o esféricas gram positivas, tienen un diámetro de 0.5-1.25 μm , *Streptococcus pneumoniae* se caracteriza por agruparse típicamente en pares o en cadenas cortas, cuando están agrupados en pares el final de los bordes distales es lanceolado, es un microorganismo inmóvil, no formador de endoesporas. (78,79,80)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

La incidencia de enfermedad neumocócica es alta en infantes menores de dos años y personas mayores de sesenta años de edad. *Streptococcus pneumoniae* es la segunda causa de meningitis bacteriana y otitis media aguda (solo por detrás

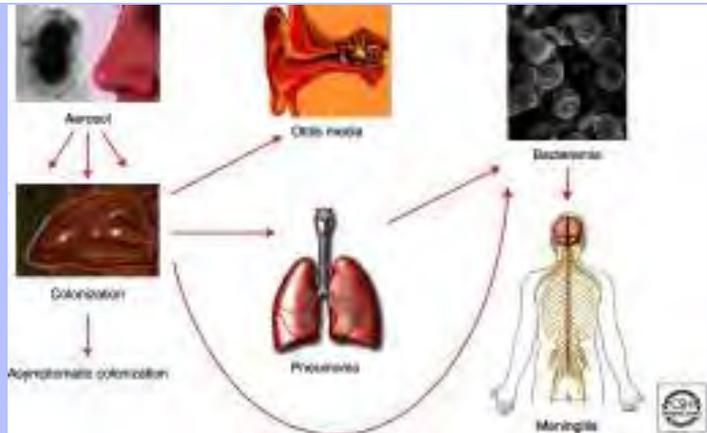


Ilustración 24 Transmisión, Colonización e Infección (90)

de *Haemophilus influenzae*) en niños, además de ser el agente etiológico más importante en la neumonía adquirida en la comunidad en personas adultas y es el segundo agente que provoca meningitis solo por detrás de *Neisseria meningitidis*.^(88,89,90)

Pruebas de identificación (70)

Solubilidad en billis



Sensibilidad a la Optoquina (sensible)



Factores de virulencia^(88,90)

Cápsula

Pared celular de polisacáridos

Pneumolisina

Autolisina

Neuroaminidasa

Peróxido de hidrógeno

Proteasa IgA1

Permeasas peptidas

Métodos de conservación

Crioconservación (cinco años)

Resiembra continua (tres meses).

Medio de conservación

Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Temperatura de conservación

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C

Resiembra continúa.

Medio de propagación

ASC 5% y AST

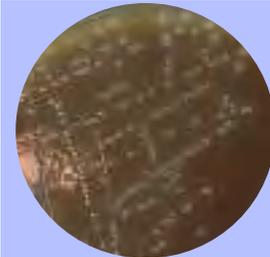
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Enterococcus faecalis ATCC ® 29212

Descripción de morfología macroscópica

Enterococcus faecalis crece en agar sangre a las 24 horas de incubación, llega a tener un tamaño entre 0.5 mm y 1 mm, a menudo son colonias blancas o grisasea, normalmente son α -hemólisis o no presentan hemólisis, algunas cepas llegan a desarrollar β -hemólisis. Puede desarrollarse en un rango de temperatura de 10- 40 °C siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35-37 °C, puede llegar a tener una reacción débil positiva para la reacción de catalasa y se da por una pseudo catalasa, se desarrollan en medios de cultivo que contienen altas concentraciones de NaCl (6.5%) y más del 90% de la cepas tienen el antígeno lipoteicoico del grupo D de Lancenfield. (79,91)

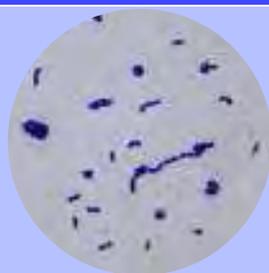


ASC5%



Resistencia a la bacitracina

Descripción de morfología microscópica



Enterococcus faecalis es un coco gram positivo que puede incluso verse en forma ovoideo o de bala, normalmente se encuentran las células agrupadas de forma individual, pares o en cadenas muy cortas. (79,91)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Puede ser el agente etiológico para infecciones del tracto urinario (complicadas), bacteremia, endocarditis, infecciones intraabdominales y pélvicas, puede causar infecciones en heridas ó tejidos blandos, sepsis neonatal e incluso en raras

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

ocasines puede causar meningitis. En los últimos años *E. faecalis* ha tomado una relevancia sin igual, es importante mencionar que es una de las especies asociada con infecciones nosocomiales con mayor frecuencia además de que muchas de sus cepas son multidrogo resistentes, pero se ha vuelto importantes las cepas vancomicina resistentes. (92,93)

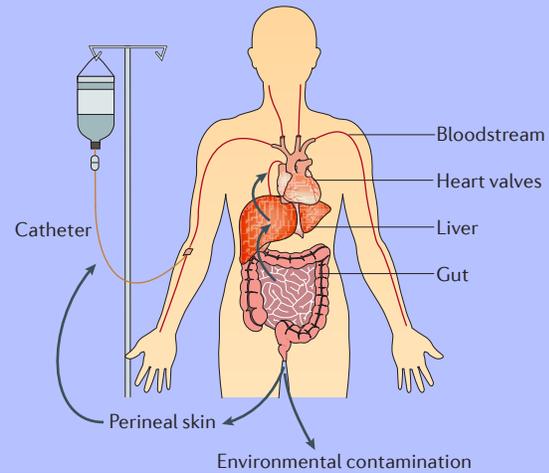


Ilustración 25 Vías de acceso de *Enterococcus faecalis*

Pruebas de identificación (70,79)

Catalasa -		Arginina dihidrolasa	
Bilis Esculina +		Arabinosa -	

Factores de virulencia (92,94)

Citolisina

Proteasa (Gelatinasa)

Sustancia agregate

Hialuronidasa

Feromonas

AS-48 (Bacteriomicina)

Ácido lipoteicoico

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

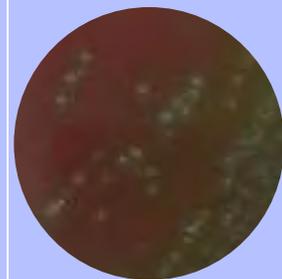
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (5 años) Resiembra continua (tres meses)	Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37°C	18-24 horas

Corynebacterium diphtheriae

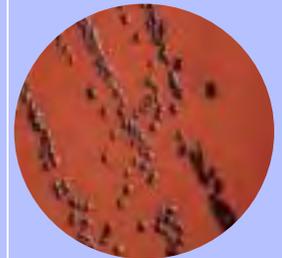
Descripción de morfología macroscópica

Las cepas de *Corynebacterium diphtheriae* cuando son cultivadas en agar sangre varían de tamaño y apariencia pero normalmente a las 24 horas de incubación miden 1-3 mm y puede mostrar un banda estrecha de hemólisis, en agar sangre con telurito (con 0.04% de telurito de potasio) son colonias pequeñas que pueden ir desde un gris oscuro a negro.

Cuando son cultivadas en agar modificado de Tinsdale las colonias pueden llegar a medir de 1-2 mm y cada colonia tiene alrededor un halo de color negro marrón que es producido por el microorganismo cuando metaboliza la cisteína. (95,96)



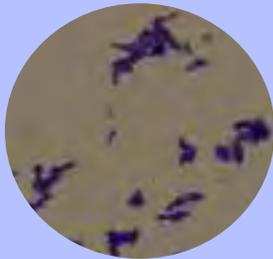
ASC5%



AGAR SANGRE CON TELURITO

Descripción de morfología microscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



El bacilo de la difteria es un organismo gram positivo que puede ser recto o ligeramente curvo, no esporulado, no capsulado y carece de movilidad, normalmente hay una protuberancia en algún extremo del bacilo o incluso se puede presentar en ambos extremos de la célula, puede medir de 1-8µm de largo por 0.3-0.8 µm de ancho, se agrupa con la apariencia de ideogramas chinos, las células individuales parecen manchas irregulares, cuando son coloreadas con azul de metileno de Loeffler se evidencian los gránulos metacrómicos. (95,96)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Corynebacterium diphtheriae

infecta la nasofaringe y la piel, pero solo las cepas toxigénicas tienen la capacidad de secretar una exotoxina que es la causante de la difteria, las cepas toxigénicas son lisogénicas para una familia de

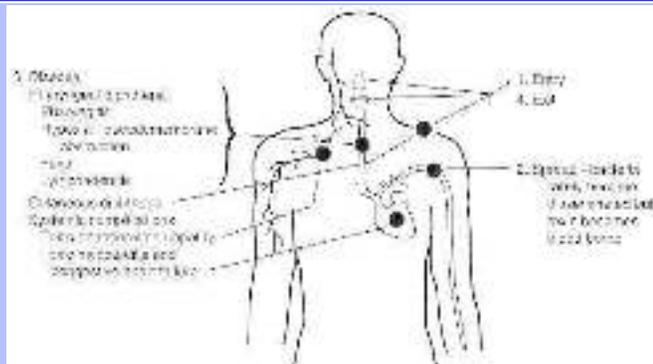


Ilustración 26 Patogénesis de la difteria

corinebateriófagos que llevan el gen estructural (*tox*) para la toxina difterica.

Los síntomas de la difteria incluyen faringitis, fiebre, hinchazón en el cuello o el área que rodea la lesión en la piel, las lesiones diftericas están cubiertas por una pseudomembrana, esta pseudomembrana está cubierta por fibrina, bacterias y células inflamatorias, la formación de la pseudomembrana puede provocar la hipoxia debido a la obstrucción de la vía aérea. Las complicaciones sistémicas que amenazan la vida del paciente son provocados por acción de la toxina difterica y se caracterizan por la pérdida de acción motora e insuficiencia cardíaca congestiva que pueden llevar a la muerte. (97,98,99) (99)

Pruebas de identificación (70,96)

Catalasa +		Glucosa +	
Urea -		Maltosa +	
		Sacarosa +	

Factores de Virulencia (96,97)

Toxina difterica

El gen estructural para la toxina diftérica, es portado por una familia de corinebariofagos. La regulación de la expresión del gen tox está mediado por un represor activado por hierro (DtxR) que esta codificado en el genoma de *C. diphtheriae*, en condiciones en las que el hierro se convierte en el sustatro limitante de la verlocidad de crecimiento, cuando hay una baja concentración de hierro se

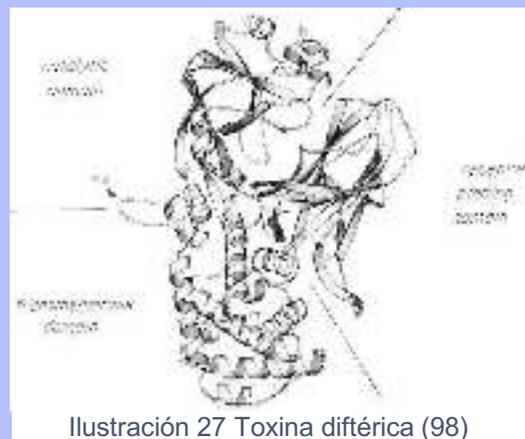


Ilustración 27 Toxina diftérica (98)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

disocia de DtxR, el gen tox se desreprime y la toxina diftérica se sintetiza y se secreta en el medio de cultivo a su velocidad máxima. (97)

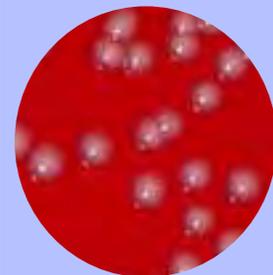
La toxina diftérica es extraordinariamente potente, solamente es necesario una cantidad de 100 -150 ng/kg para tener efectos letales.

Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (cinco años) Resiembra continua (tres meses)	Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37°C	18-24 horas

Corynebacterium xerosis

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *Corynebacterium xerosis* son muy pequeñas, con forma circular miden 0.2-1.0 mm de diámetro después de 24 horas de incubación, son colonias secas que algunas pueden tener un pigmento color amarillo, son colonias no hemolíticas, cuando crecen en medio de cultivo líquido forman una película larga en la superficie y el tubo se mantiene claro y presenta algunos grumos asentados en el fondo del tubo. (95,96)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



Son bacilos gram positivos que miden de 1-8 μm por 1 μm , que se tiñen de manera irregular, presentan gránulos metacromáticos de manera ocasional, las células se pueden encontrar de forma individual o se agrupan en forma de V o Y. (95,96,98)

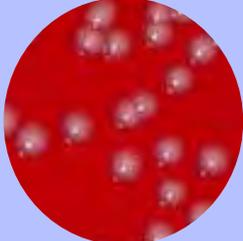
Epidemiología y aspectos clínicos.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Corynebacterium xerosis normalmente está presente como comensal en la piel humana y en el saco conjuntival, es clasificado como un microorganismo difteroide y generalmente es inocua, sin embargo puede tomar un rol como patógeno en huéspedes inmunocomprometidos.

Entre las infecciones que ha sido reportado como agente patógeno se encuentra la endocarditis, septicemia, pleuropneumonia, artritis séptica, osteomielitis y se han reportado ultimamente casos frecuentes de mediastinitis. (98) (100)

Pruebas de identificación (70,96)

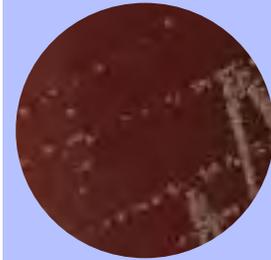
Catalasa +		Fermentación	
Hemólisis –		Glucosa +	
		Sacarosa +	
Métodos de conservación		Medio de conservación	
Crioconservación (cinco años). resiembrada continua (tres meses)		Caldo Soya tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).	
Temperatura de conservación		Medio de propagación	
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembrada continua.		ASC 5% y AST	
Temperatura de incubación		Tiempo de incubación	
37 °C		18-24 horas	

Rhodococcus equi

Descripción de morfología macroscópica

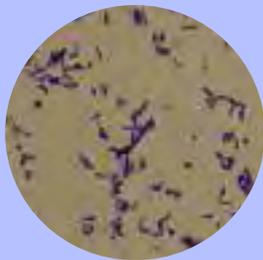
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Las cepas de *R. equi* crecen bien en medios de cultivos estandares utilizados por la mayoría de los laboratorios y tienen un mejor desarrollo cuando son cultivados en medios empleados para el cultivo de actinomicetos, las colonias tienen un diámetro 0.25-2 mm después de 24 horas de incubación, el aspecto de la colonia puede ser rugoso, liso o mucoide, las colonias además pueden ser opacas o brillosas, la mayoría de las cepas desarrollan un pigmento que puede ir desde colores crema y pueden hasta desarrollar pigmentos de color, amarillo, anaranjado, rosa o rojo aunque tambien existen cepas que son totalmente incoloras. (101,102)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



La morfología de *Rhodococcus equi* es peculiar es un coco bacilo gram positivo pleomórfico y se diferencia de la mayoría de las bacteria por tener la capacidad de formar hifas en muchas de sus cepas aisladas, estas hifas tiene la capacidad de fragmentarse en formas cocoide o bacilar.

La característica de mostrar ambas morfologías en una muestra puede complicar la identificación pudiendo generar confusión pensando que no se aisló la cepa correctamente. Se ha reportado cepas que solo pueden presentar una sola morfología principalmente en forma de bacilo.

Una de las características importantes para diferenciar *Rhodococcus equi* es su capacidad de ser parcialmente ácido-alcohol resistente, se agrupa en forma de ideogramas chino. (101,102)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Rhodococcus equi es un inusual causa de infección en humanos y es extremadamente raro encontrar un caso en pacientes inmunocompetentes, hasta el día de hoy solo se han reportado 19 casos en este tipo de pacientes (103), las infecciones de *R. equi* descritas se presentan en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en los pacientes que padecen SIDA, pero hay otros grupos de pacientes a los cuales se les ha asociado un riesgo de contraer infecciones por *R. equi* ejemplos claros son los pacientes con trasplante, con linfoma, falla renal crónica, alcoholismo, cancer de pulmón, leucemia, diabetes mellitus y otros estados de inmunodeficiencia que son los mas vulnerables.

La neumonía es la principal enfermedad causada por *R. equi*, pero en especial la neumonía invasora con formación de cavitaciones es observada en pacientes con VIH, aunque existen otras formas de infección que puede participar, como son la endoftalmitis, osteomielitis, pleuresía e infección de herida. (104,105)

Pruebas de identificación (70,101)

Catalasa +		Ureasa +	
------------	---	----------	---

Factores de virulencia (101)

<p>Cápsula de polisacáridos</p> <p>Vap antigenos</p> <p>Exoenzima (colesterol oxidasa)</p> <p>Capacidad de replicarse dentro de los macrófagos</p>	<p>Pared celular de ácidos micolicos</p> <p>Expresión de la lipoproteína expresada en superficie</p> <p>Productos codificado por un plásmido asociado a la virulencia</p>
--	---

Métodos de conservación

Medio de conservación

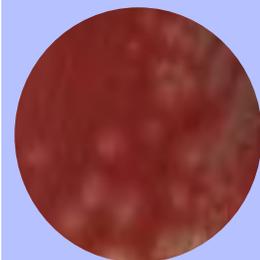
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Crioconservación (cinco años) Resiembra continua (tres meses).	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Bacillus cereus ATCC® 14579

Descripción de morfología macroscópica

Bacillus cereus tiene un buen crecimiento en condiciones aerobias en agar sangre de carnero, pueden llegar a medir de 2-7 mm de largo, las colonias son de color gris opaco, tienen una superficie rugosa mate, el perímetro de las colonias es irregular y presentan la configuración de swarming por la motilidad que exhiben las cepas. Una de las características importantes de la morfología es la zona de β -hemólisis alrededor de la colonia. (96,106)

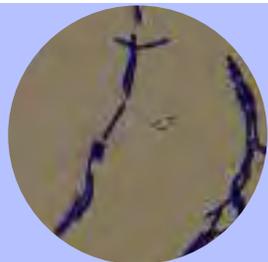


ASC 5%



β -hemólisis

Descripción de morfología microscópica



B. cereus es un bacilo esbelto gram positivo, ligeramente curvo y sus extremos son cuadrados, normalmente se agrupa en pequeñas cadenas cortas, pares o células individuales, exhiben esporas ovaladas que se ubican en el centro de la células. (96,106)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Epidemiología y aspectos clínicos.

Las infecciones que provoca *B. cereus* se pueden dividir como infecciones intestinales y no intestinales. La infección intestinal que provoca *B. cereus* es la gastroenteritis y es una enfermedad transmitida por comer alimentos contaminados con una exotoxina producidas por *B. cereus*, la gastroenteritis es dividida como enfermedad de corta incubación y la de incubación prolongada. La primera se caracteriza por el inicio de los síntomas de 1 a 6 horas después de la ingesta de alimentos contaminados, provocando vómitos y cólicos abdominales, la exotoxina responsable se denomina cereulida.

La gastroenteritis de incubación prolongada ocurre de 8 a 16 horas después de la ingesta de alimentos contaminados y se caracteriza por el inicio de un diarrea acuosa profusa, náuseas, tenesmo y cólicos abdominales hipogástricos, este tipo de gastroenteritis esta asociado a cuatro exotoxinas, una enterotoxina no hemolítica NHE, dos complejos proteícos (BL y HBL) y dos proteínas enterotóxicas (citotoxina T y citotoxina K).

Dentro de las infecciones no intestinales las más importantes son las asociados a procedimientos quirúrgicos, inmunosupresión, heridas traumáticas, quemaduras, hemodiálisis y el abuso de drogas parenterales (bacteremia y endocarditis), infecciones oculares, musculoesqueléticas, incluso puede llegar a provocar meningitis, meningoencefalitis, y absceso encefálico. (107,108,109)

Pruebas de identificación (96,108,110)

Catalasa +

Producción de ácido a partir de

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Arginina dihidrolasa +		Arabinosa – 	Trehalosa + 
		Manitol – 	Inulina – 

Factores de virulencia ⁽⁹⁶⁾

Cereudila

Endotoxina no hemolítica

Complejo proteico BL

Complejo proteico HBL

Citotoxina K

Citotoxina T

Métodos de conservación

Crioconservación (cinco años)

Resiembra continua (tres meses).

Medio de conservación

Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Temperatura de conservación

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C
Resiembra continua.

Medio de propagación

AS 5% y AST

Temperatura de incubación

Tiempo de incubación

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

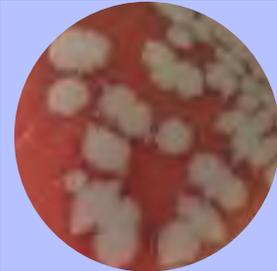
30 °C

18-24 horas

Bacillus anthracis

Descripción de morfología macroscópica

La morfología colonial es muy similar a la de *Bacillus cereus*, las colonias de *Bacillus anthracis* son más pequeñas, de un color blanco grisáceo, de superficie rugosa y tiene un consistencia viscosa, la principal diferencia es que las colonias de *B. anthracis* no son hemolíticas, las colonias que son capsuladas y son muy mucoides. (96,106)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



Son bacilos grampositivos que miden de 1.2 a 1.4 μm de ancho y pueden llegar a medir de 2-7 μm de largo, se agrupan en células individuales o en cadena, incluso algunas veces se pueden llegar agrupar en forma de cabeza de medusa (sobre todo cuando se observan en frotis de muestras clínicas), los extremos de estos bacilos pueden ser cuadrados o cóncavos, se pueden observar la formación de esporas centrales o subterminales y la célula no se encuentra tumefacta en el área donde se localiza la espora. (96,106)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Bacillus anthracis es el agente causal del carbunco o ántrax maligno y se caracteriza por ser una enfermedad aguda y grave, que tiene la capacidad de afectar a todos los organismos endotermos, la gravedad de la infección está sujeta a la forma de como se adquiere la enfermedad.

Se puede dividir en cuatro formas clínicas distintas. El carbunco cutáneo representa la forma más común y protagoniza aproximadamente el 95 % de todos los casos de carbunco, es adquirido a través del contacto directo de mucosas con algún animal infectado.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

La segunda forma más común es el carbunco pulmonar y se da como consecuencia por la inhalación de las endospors, esta forma es las más agresiva al estar asociada a un 80-90% de mortalidad.

Las formas menos comunes son el carbunco orofaríngeo y el gastrointestinal, estas dos formas son adquiridas por la ingestión de alimentos mal cocidos que contengan esporas o células vegetativas. (111,112,113)

Pruebas de identificación (70,96)

Catalasa +		Producción de ácido a partir de	
		Arabinosa –	Trehalosa +
Arginina dihidrolasa +		Manitol –	Inulina –
			
		Salicilina –	

Factores de virulencia (113)

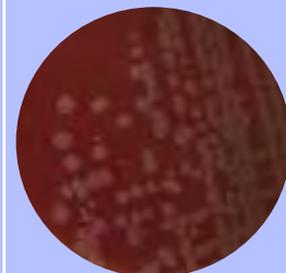
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Plásmido pXO1 Antígeno protector Factor de edema	Factor letal Cápsula
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (cinco años) Resiembra continua (tres años).	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continua.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
30 °C	18-24 horas

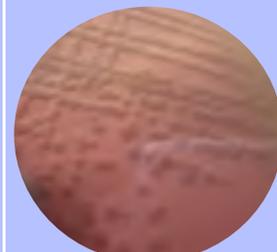
Bacillus subtilis ATCC® 6633

Descripción de morfología macroscópica

Las forma de las colonias de *Bacillus subtilis* varían, pueden ser completamente redonda a irregular y normalmente alcanzan un diametro moderado de entre 2-4 mm, los margenes de colonia pueden variar desde ser ondulante hasta tener pequeñas proyecciones, son opacas o rugosas, el color de la colonia va desde un color blanquecino o ser cremoso hasta un color marrón, su textura tiene variantes desde cremoso o mucoide, pueden formarse pigmentos que varían desde crema a amarillo incluso algunas cepas pueden producir pigmentos de color rosa a rojo a marrón o negro. Debe señalarse que hay una variabilidad morfológica entre cepas diferentes pero incluso dentro de una misma cepa. (96,106)



ASC5%



Sin hemólisis

Descripción de morfología microscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



Son bacilos gram positivos, que tienen la capacidad de formar esporas elipsoidales a cilíndricas que pueden estar localizadas en el centro o ser subterminales. Las cepas tienen un tamaño uniforme entre 0.7-0.8 μm por 2-3 μm y se encuentran por lo regular de manera individual o pares, muy raramente se encuentran en cadenas, cuando hay presencia de cadenas éstas son muy cortas. (96,106)

Aplicación y uso

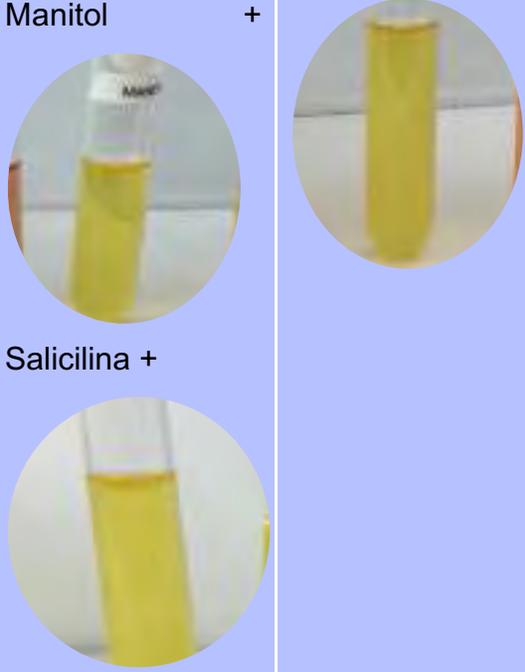
Bacillus subtilis no está reconocido como patógeno humano y tiene un papel importante en la industria biotecnológica, este microorganismo es utilizado para producir proteínas recombinantes. En la actualidad aproximadamente el 60% de las enzimas que se encuentran disponibles comercialmente son producidas por alguna especie del género *Bacillus*. El interés sobre *Bacillus subtilis* inició con el estudio de la absorción así como la unión del DNA y el proceso de esporulación. Los factores que lo convirtieron en el organismo de elección para la aplicación industrial son su alta susceptibilidad para la ingeniería genética y la fermentación a grandes escalas, los altos rendimientos obtenidos de los procesos de fermentación (20 a 25 gramos por litro) y la falta de subproductos tóxicos.

(114,115,116,117)

Pruebas de identificación (70,96)

Catalasa +		Producción de ácido a partir de	
Arginina dihidrolasa -		Arabinosa - 	Trehalosa +
			Inulina V+

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

		Manitol + 
Métodos de conservación		Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)		Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación		Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.		ASC 5% y AST
Temperatura de incubación		Tiempo de incubación
30 °C		18-24 horas

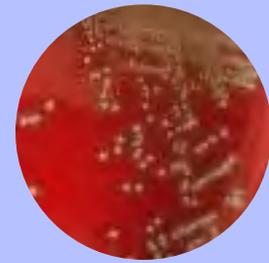
Lactobacillus acidophilus

Descripción de morfología macroscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

En medio sólido crecen colonias pequeñas que suelen tener un tamaño promedio entre 2-5mm, con margenes enteros, son convexas, lisas, brillantes y no desarrollan ningún pigmento.

El crecimiento en medio líquido normalmente ocurre en todo el líquido, es importante mencionar que este género es llamado así por la capacidad de producir ácido láctico y algunas veces puede llegar a representar más del 50% del total de los productos terminales a partir de la fermentación de la glucosa. (96,118)



ASC5%

Descripción de morfología microscópica



Tienen una forma celular bacilar, son organismos inmóviles con extremos redondeados que miden 0.6-0.9 por 1.5-6 μm , las células se encuentran en forma individual o agrupadas en pares e incluso en cadenas cortas, normalmente son bacilos gram positivos delgados aunque algunas veces puede presentar una forma de bacilo corineformes o incluso tener formas similares a cocobacilos. (96,118)

Aplicación y uso

Los lactobacilos son microorganismos que forman parte de la flora normal de la vagina, el tubo digestivo y la orofaringe de los humanos. Están ampliamente distribuidos en diversos ámbitos y también comprenden parte normal de muchas otras especies animales. También se encuentran en distintos alimentos (productos lácteos, granos, comidas, peces y chucrut), en gran parte por su capacidad fermentativa, *Lactobacillus acidophilus* es agregado a los alimentos como cepa probiótica que se encuentra disponible en alimentos como son leche, yogur y fórmula infantil. Entre los beneficios que se conocen es que disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon, ha disminuido la incidencia de diarrea pediátrica y principalmente ayuda a la digestión de la lactosa en sujetos intolerantes a la lactosa. (118,119,120)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Pruebas de identificación (70,96,118)

Catalasa –		Producción de ácido a partir de	
		Arabinosa + 	Rafinosa – 
		Manitol + 	Ribosa – 
Oxidasa –		Melibiossa – 	Sorbitol – 
Indol –			

Clostridium septicum

Descripción de morfología macroscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Las colonias se desarrollan en agar sangre de carnero y tienen un diámetro entre 1-5 mm, las colonias pueden ser circulares con bordes notablemente irregulares a rizoides, tienen una ligera elevación, son traslucidas, grises, brillantes y son β -betahemolíticas, la temperatura óptima de crecimiento es de 37-40 °C, el CO₂ no es estrictamente necesario para su crecimiento, aunque es mucho mejor cuando hay una atmósfera 100 % de CO₂. (121,122)



Descripción de morfología microscópica



Las células de *Clostridium septicum* tienen forma de bacilo, gram positivo se pueden presentar como barillas rectas o curvada, los cultivos jóvenes se tiñen fuertemente gram positivos, pero cuando un cultivo es viejo algunos bacilos se pueden teñir como gram negativos, miden aproximadamente 0.6-1.9 μm por 1.9-35 μm .

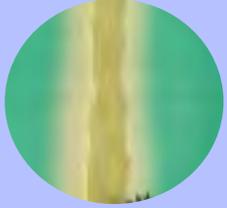
Las esporas que desarrolla son ovaladas, subterminales y distendidas en la célula. (121,122)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Clostridium septicum es un patógeno inusual en el ser humano, aunque puede causar algunas infecciones como abscesos, celulitis, gangrena gaseosa, enterocolitis neutropénica así como sepsis, es importante señalar que forma parte de la microbiota intestinal en los seres humanos y sólo representa el 1% de las infecciones provocada por el género *Clostridium*. La mayoría de los casos de infecciones son encontradas en personas que padecen algún tipo de cáncer sobre todo leucemias, linfomas y cáncer de colon. (123)

Pruebas de identificación (70,121)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Catalasa –		Proteólisis de la leche –	
Hidrólisis de la esulina +		DNasa+	

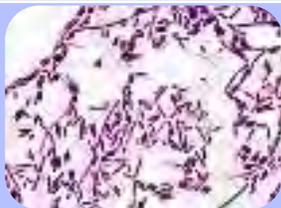
Clostridium sporogenes ATCC® 19404

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias superficiales en placas de agar sangre son de 2-6 mm de diámetro, irregularmente circulares, poseen un borde grueso de forma rizoide, tienen un centro de color amarillo-grisáceo que se encuentra elevado y la colonia tienen una periferia aplanada compuesta de filamentos enredados las colonias completas dan una forma similar a una cabeza de medusa, las colonias son opacas, tienen una superficie mate, siendo por lo general β -betahemolíticas y se adhieren firmemente al agar. (121,122)



Descripción de morfología microscópica



Son bacilos rectos gram positivos, que se encuentran agrupados en un frotis de manera individual o en pares, las esporas que producen son ovaladas, subterminales y distendidas en la célula. (121,122)

Aplicación y uso

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Clostridium sporogenes se ha utilizado ampliamente como sustituto no toxigénico de *Clostridium botulinum* proteolítico en la validación de procesos termicos para alimentos estables a baja acidez, *Clostridium sporogenes* además es un microorganismo que coloniza el trato gastrointestinal humano, en el intestino utiliza el triptófano para sintetizar indol y posteriormente ácido 3-indolpropiónico (IPA), el IPA es un tipo de auxina que actúa como un potente antioxidante en el cuerpo y el cerebro humano. (124,125)

Pruebas de identificación (70,121)

Catalasa –



Hidrólisis de la
esculina +



Proteolisis de la
leche +



Escherichia coli ATCC® 25922™

Descripción de morfología macroscópica

Escherichia coli normalmente crece bien en agar sangre de carnero, las colonias son convexas, brillantes, húmedas y de color gris, miden entre 2-3 mm de diámetro después de 24 horas de incubación, las cepas que son capsuladas frecuentemente son perfectamente circulares. Cuando hay variantes rugosas las cepas suelen ser colonias planas, secas, opacas, arrugadas y de borde borroso, este tipo de colonias suelen ser mas grandes (1-5 smm). En agar MacConkey las colonias son de color rosa (fermentan la



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

lactosa) y pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis, algunas cepas son fermentadoras lentas de la lactosa, estas son colonias incoloras tienen un punto rosa en las colonias. En agar con Eosina y Azul de Metileno las colonias son de color negro azulado con formación de un precipitado verde metálico. (126) (127)

Descripción de morfología microscópica



Escherichia coli es un bacilo recto gram negativo con extremos redondeados, tienen un diámetro de 1.1-1.5 μm por 2.0-6.0 μm de longitud, puede encontrarse de manera individual o agruparse en pares, es indistinguible por su morfología microscópica de muchos de los bacilos que forman la familia *Enterobacteriaceae*. (126) (127)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Aunque *Escherichia coli* puede ser un residente inocuo del tracto gastrointestinal, también tiene la capacidad patógena de causar enfermedades diarreicas y extraintestinales significativas, es tan importante en el laboratorio de microbiología que es el microorganismo que se asocia a infecciones con mayor frecuencia y por lo cual es el microorganismo que se aísla con mayor regularidad, una característica importante es que *E. coli* además de encontrarse en el tracto intestinal del ser humano, también se puede encontrar en el intestino de todos los animales de sangre caliente y en el medio ambiente. (128)

Las cepas de *E. coli*, se han clasificado serotípicamente de acuerdo al esquema de Kauffman, la cual se encarga de determinar los polisacáridos O (somáticos) y los antígenos de superficie H (flagelar), actualmente se han reportado 174 combinaciones que puede existir, son 10 antígenos O reconocidos y 53 H, muy pocos serotipos son asociados en causar enfermedades en los seres humanos, además de ser una forma complicada de clasificar a las cepas. (128)

Otra forma de clasificar las cepas de *E. coli* son por su capacidad patógena (patotipos o patovariedad) son ampliamente estudiadas en humanos, animales,

alimentos y el medio ambiente. Esta clasificación asocia cepas que tienen características comunes que ocupan cada uno de los patotipos para colonizar la mucosa intestinal, causar enfermedad, el curso de la misma y las complicaciones que pueden presentarse. (129)

Patotipos comunes que provocan enfermedades diarreicas

Escherichia coli enteropatógena (ECEP)

Fue el primer patotipo identificado, se caracteriza en base a su mecanismo fisiopatológico que da origen al cuadro diarreico y se relaciona principalmente por la alteración provocada en las células epiteliales intestinales debido a la adhesión y borrado (A/E: attaching/effacing) y la formación de pedestales.

Las cepas ECEP son el agente causal de diarrea en niños menores de dos años, que suelen causar brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales, la enfermedad puede ir de moderada a grave, siendo asociada a una alta mortalidad (10-40%), presentándose con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. (128,130)

Escherichia coli productora de toxina shiga (STEC)

Las cepas de este patotipo se caracterizan por la presencia de alguno de los dos genes que codifican la toxina shiga (*sxt₁* o *sxt₂*), las cepas adquieren el gen a través de un bacteriofago lambda, la toxina shiga también es llamada verocitotoxina, hay más de 400 serotipos de STEC identificados, pero solo un subconjunto de serotipos se ha correlacionado con la enfermedad en humanos. STEC es un patotipo diverso que puede causar desde una diarrea leve hasta sanguinolenta. (128,131)

Las cepas que ejemplifican el grupo STEC son las *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), éstas cepas son un subconjunto que pertenece a STEC que provoca

colitis hemorrágica, el serotipo más común es el O153:H7, este serogrupo además ha sido reconocido como un adulterante de la carne desde 1994, hoy en día se han declarado seis nuevos serogrupos (O26, O45, O103, O111, O121 y O145) y todas ellas están asociadas con enfermedades graves en humanos. (128)

Los seres humanos pueden infectarse de forma asintomática o pueden desarrollar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico, algunos casos se resuelven sin tratamiento, la mayoría de los casos sintomáticos comienzan con diarrea, que puede evolucionar a una colitis hemorrágica en unos días caracterizándose por diarrea con sangre profusa y visible, en el 16% de los casos de colitis hemorrágica puede llegar a desarrollarse el síndrome urémico hemolítico, el síndrome es más frecuente en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Generalmente el síndrome se caracteriza por la insuficiencia renal, anemia hemolítica y trombocitopenia. (128,132,133)

Escherichia coli de adherencia difusa (DAEC)

Este grupo describe a las cepas de *E. coli* diarreogénicas que se unen a las células, pero que no entran dentro de los patrones de la *E. coli* enteropatógena. Es muy difícil su clasificación e identificación y se ha identificado por la adherencia difusa a las células epiteliales (HEp-2), donde la adherencia bacteriana se lleva en toda la superficie de la células epiteliales con un patrón disperso.

Las cepas DAEC se asocian con diarrea acuosa que se puede volver persistente en niños pequeños, y los casos más graves se han reportado en niños entre 18 meses hasta cinco años. Se cree que los adultos se vuelven portadores asintomáticos. (128,129,133)

Escherichia coli enteroagregativa EAEC

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

La EAEC se identificó comparando los patrones de adherencia de más de 500 aislamientos, desde su identificación inicial ha sido aislada e identificada en todo el mundo en brotes diarreicos endémicos y epidémicos. En varios estudios se ha encontrado que es el patógeno bacteriano más común identificado en muestras de heces diarreicas. Es causante de diarrea persistente en niños donde EAEC es endémica y también en pacientes infectados por el VIH, siendo un importante patotipo causante de la diarrea del viajero

La transmisión ocurre principalmente a través de agua y alimentos contaminados como en el caso de ensaladas, postres y aderezos. . (128,129,133)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)

El grupo EIEC y *Shigella spp* están relacionadas genética y bioquímicamente ya que son lisina descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colón, para que suceda esto, primero la bacteria se adhiere a las vellosidades de la mucosa requiriendo de musinas y adhesinas, para entrar más tarde por endocitosis a la célula, posteriormente se multiplica dentro de la célula y se disemina a las células sanas adyacentes. Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son la diarrea acuosa, con sangre y moco. Las cepas EIEC se asocian con brotes aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por la ingestión de alimentos y agua contaminados. (128,129,133)

Escherichia coli enterotoxigenica (ETEC)

ETEC es un patotipo diverso, que es una de las principales causas de la diarrea del viajero y endémica en los países subdesarrollados. Este patotipo puede aislarse en portadores asintomáticos como sintomáticos, con tasas de mortalidad significativas en niños. Las cepas ETEC se caracterizan por su capacidad para

producir enterotoxina termolábil o estable al calor además de portar un conjunto de factores de colonización.

Las cepas ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de los pilis o fimbrinas, una vez colonizado el intestino sintetizan alguna de las dos toxinas, cualquiera de las toxinas provocará el aumento del cAMP y cGMP, estas moléculas se encuentran en la membrana de las células intestinales, lo que ocasionará la salida de agua y iones.

Las infecciones relacionadas ETEC se presentan en lactantes, principalmente en niños menores de dos años y en particular durante los primeros seis meses de vida, el cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en muy pocos casos se presenta fiebre y vómito. (128,129,133)

Escherichia coli adherente e invasiva (AIEC)

Las cepas pertenecientes al patotipo AIEC se han implicado como uno de los agentes causantes de la enfermedad de Crohn alrededor del 30% de los casos, la cual se caracteriza por causar enfermedad intestinal inflamatoria crónica, que afecta principalmente al intestino delgado. En la actualidad no se considera que hay un solo agente causante de la Enfermedad de Crohn identificado, la hipótesis actual es que la enfermedad es causada por la combinación de factores, incluido el genético, la microbiota intestinal, los factores ambientales y los patógenos entéricos. Los otros patógenos que se han ligado a la enfermedad de Crohn son *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, algunas especies de *Campylobacter* y *Citomegalovirus*.

La patogénesis de este grupo es definida por su capacidad de adherirse e invadir a las células, teniendo la capacidad de replicarse dentro de las células epiteliales y los macrófagos (128,129,133)

Escherichia coli extraintestinal

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Las infecciones del tracto urinario, las sepsis y la meningitis, son los síndromes de infección extraintestinal más estudiados causados por *Escherichia coli*, aunque tiene la capacidad de causar otro tipo de infecciones como son la neumonía, peritonitis espontánea, osteomielitis, abscesos, etc. Estas cepas constituyen un subconjunto distintivo de la población de *E. coli*, que se caracteriza por un predominio del grupo filogenético B2, diversos factores de virulencia como lo son adhesinas, sistemas de secuestro de hierro, toxinas y recubrimientos de polisacáridos. Además el tratamiento de enfermedades extraintestinales asociadas a *E. coli* se ha complicado por la aparición de resistencia a los antimicrobianos. (128,133)

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa -		Citrato -	
Indol +		Urea -	
RM +		Fermentación de la lactosa +	

Factores de virulencia (133)

Toxinas	Plásmido transmisibles
Lipopolisacáridos (endotoxinas)	Adhesinas
Shiga	Hemolisinas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Toxina termoestable	Bacteriocinas
Toxina termolábil	
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembrada continua (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembrada continua.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis

Descripción de morfología macroscópica

Los medios donde se aíslan normalmente el género *Salmonella* son Agar MacConkey, Agar S-S, Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, Agar entérico de Hektoin, Agar Verde Brillante y Sulfito Bismuto. Cuando las muestras son de origen clínico se recomienda enriquecer la muestra (Medio de tetrionato de Muller), con la finalidad de aumentar la proporción de las células de *Salmonella* de otras bacterias que forman parte de la microbiota que puedan acompañar a la muestra.

En agar MacConkey las colonias de *Salmonella sp.* al no tener la capacidad de fermentar la lactosa permanecen incoloras y traslúcidas, el color del medio puede ir desde tonalidades ligeramente anaranjado a ámbar. En el Agar S-S las colonias de *Salmonella sp.* son incoloras con centros negros debido a la producción de H₂S. En Agar Xilosa Lisina Desoxicolato las colonias pueden ser amarillas hasta de un color rojo con centros negros, las colonias características



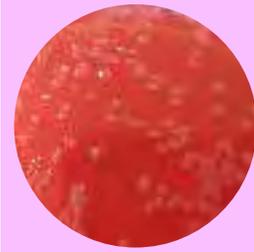
ASC 5%



Agar MacConkey

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

son de color rojo con centros negros en este medio. Hay medios que tiene mayor grado de diferenciación como es el caso de medio entérico de Hektoin, en este agar las colonias son de color verde o verde azulado con centros de color negro, el agar verde brillante es un medio altamente selectivo y es utilizado para aislar salmonelas distintas de *S. typhi* las colonias son de color rojo y algunas subespecies pueden ser de color blancas a rojas, rodeadas de zonas rojas, en este medio tanto *S. typhi* como *S. paratyphi* es inhibido o solo presenta trazas de crecimiento. Uno de los medios altamente selectivos es el agar sulfito bismuto, es usado principalmente para aislar *Salmonella* sp, particularmente *Salmonella typhi* a partir de muestras clínicas y de comida. Las colonias se ven típicamente de color negras que se encuentran rodeadas por una zona negra o marrón negruzca que puede estar varias veces más grande que el tamaño de la colonia y las colonias en el caso particular de *Salmonella typhi* tienen un brillo metálico característico. (126,134)



Agar Verde Brillante



Agar Sulfito Bismuto



Agar
Salmonella-Shigella

Descripción de la morfología microscópica



Son bacilos gramnegativos rectos 0.7-1.5 por 2.0-5.0µm, es indistinguible a nivel microscópico de los otros generos que forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente es móvil a través de flagelos peritricos. (126,134)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Salmonella enterica es un anaerobio facultativo intracelular que tiene importancia mundial, se calcula que causa 1300 millones de enfermedades en todo el mundo.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Se han identificado más de 2500 serovares de *Salmonella enterica* que se subdividen en seis subespecies distintas, las especies de *Salmonella* también pueden ser dividido a través de serovares que se pueden diferenciar por sus estructuras flagelares, de carbohidratos y lipopolisacaridos. (135)

Salmonella enterica es un patógeno típico adquirido por vía oral y tienen la capacidad de causar cuatro síndromes principalmente fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis/diarrea, bacteriemia o ser un portador crónico. (126,135)

Fiebre enterica.

La fiebre tifoidea humana ocurre después de la ingestión de *la S. enterica* serovar. Typhi, generalmente por el consumo de agua, productos de origen animal contaminada o bien por el contacto estrecho de un individuo que es un portador asintomático. La enfermedad se empieza a manifestar después de una a dos semanas después de la ingestión de la bacteria, se caracteriza por fiebre generalizada, malestar general, dolor abdominal, también puede presentarse dolor de cabeza mialgias, náuseas, anorexia y estreñimiento. (135,136)

Enterocolitis/diarrea

La enterocolitis se presenta después de la ingestión de más de 50 000 bacterias en alimentos o aguas contaminadas, los síntomas comienzan en el transcurso de 6-12 horas después del consumo de una fuente contaminada, El inicio de los síntomas es agudo siendo los más frecuentes los cólicos, el dolor abdominal así como la diarrea con sangre, algunas veces se pueden presentar náuseas y vómitos. (137)

Portador crónico

Un paciente que es reconocido como portador crónico es aquel que sigue excretando al cabo de un año los bacilos de *Salmonella*, las bacterias pueden ser

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

excretadas a través de las heces o de la orina, en los países endémicos la incidencia de portadores puede ser alrededor de 500 por 100 000 habitantes. (138)

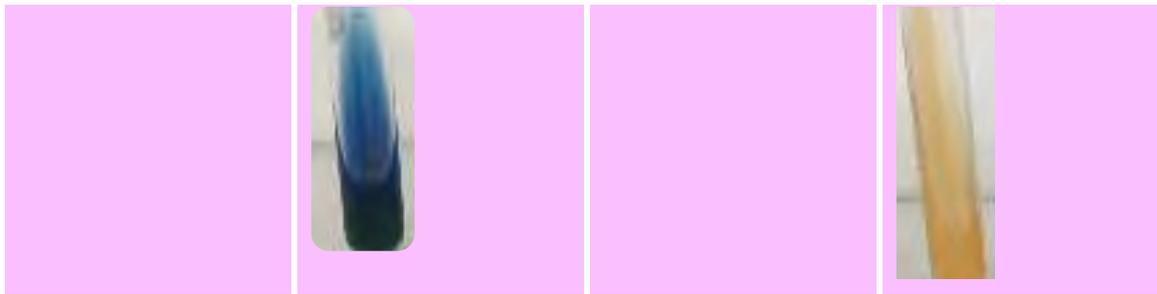
Bacteriemia

La mayoría de las bacteriemias son causadas principalmente por los grupos de *Salmonella* llamadas tifoideas serotipos (Typhi, Paratyphi (A,B y C) y Sendai. En el caso de las salmonelas no tifoideas solo el 6 % de los pacientes llegan a desarrollar bacteriemia y los grupos más vulnerables son niños, jóvenes, ancianos y los pacientes inmunocomprometidos, los serotipos que con mayor frecuencia causan bacteremia de las salmonelas no tifoideas son las variedades (Heidelberg, Dublín, Cholerasuis y Typhimurium), aunque hoy en día los pacientes que tienen enfermedad subyacentes como son VIH, diabetes. (135,136,137)

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa –		H ₂ S +	
Indol –		Lisina	
RM +		Descarboxilasa +	
Citrato +		Ornitina	
		Descarboxilasa+	
		Urea -	

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



Factores de virulencia (126,139)	
Fimbria Flagelos y Flagelina T3SS1 T3SS2	Plasmido de virulencia Superóxido dismutasa Adquisición de iones
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *Klebsiella pneumoniae* tienen un aspecto similar a un cúpula, pueden llegar a tener un diametro aproximado entre 3-4 mm, son cepas que tienen un buen crecimiento con una incubación de 18-24 horas normalmente las colonias tendrán un aspecto mucoso y la viscosidad dependera de la cepa y la composición del medio.

(126,140)



Descripción de morfología microscópica



Son bacilos rectos que miden $0.3-1.0 \times 0.6-6.0 \mu\text{m}$, que pueden estar ordenadas de manera individual, pares o cadenas cortas, frecuentemente la mayoría de las cepas estan rodeadas de una cápsula. Son gramnegativos y no pueden ser diferenciados de los otros géneros que componen la familia *Enterobacteriaceae*. (126,140)

Epidemiología y aspectos clínicos.

El género *Klebsiella* es ubíquo. Las cepas pueden encontrarse en aguas superficiales, aguas residuales, suelos y plantas. Incluso también tienen la capacidad de colonizar las superficeies mucosas humanas de algunos animales (caballos y cerdos). En los seres humanos es un comensal a nivel de nasofaringe (1-6%) y a nivel del tracto intestinal las tasas de colonización puede presentarse en una tasa variable que puede ir desde el 5-38%. (140,141)

Es de suma importancia resaltar que las tasas de colonización aumentan en los pacientes que se encuentran hospitalizados y depende del periodo de estancia intrahospitalario, las tasas de detección varían pero pueden encontrarse en las heces de los pacientes hasta el 77% de los pacientes hospitalizados, aumenta la colonización a nivel de faringe hasta un 19% y se puede encontrar hasta en el 42% de las manos de los pacientes hospitalizados y el personal del hospital. Las

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

tasas altas de colonización en los pacientes hospitalizados se asocian principalmente al uso de antimicrobianos. (141,142)

Klebsiella pneumoniae tiene la capacidad de causar diferentes clases de infecciones y destaca por ser uno de los principales agentes causales de neumonía, pero el sitio anatómico en el cual causa mayor número de infecciones es el trato urinario, además tiene la capacidad de causar bacteriemia y abscesos hepáticos. *Klebsiella pneumoniae* normalmente se asoció a causar infecciones graves en personas inmunocomprometidas, pero la reciente aparición y propagación de cepas hipervirulentas a ampliado el número de personas susceptibles a las infecciones y se han incluido personas sanas e inmunodeficientes (143). Otra de las características que ha tomado una relevancia fundamental es la alta tasa de resistencia a antibióticos, lo que hace que las infecciones que causa sean mucho más difíciles de tratar. (144)

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa –



Citrato+



Indol -



Ornitina

Descarboxilasa –



VP +



Lisina

Descarboxilasa +



Urea +

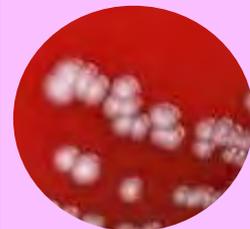
Manual para la Identificación y la conservación microbiana

	Fermentación Lactosa +	
Factores de virulencia (126,140,145)		
Antígenos capsulares Sideróforos Lipopolisacárido Resistencia a antibióticos	Ureasa Fimbrias tipo I Fimbrias tipos II Formación de biofilm	
Métodos de conservación	Medio de conservación	
Crioconservación (Cinco años) Resiembración continua (tres años)	Caldo Soya Tripticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).	
Temperatura de conservación	Medio de propagación	
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembración continua.	ASC 5% y AST	
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	
37 °C	18-24 horas	

Enterobacter cloacae ATCC® 13047

Descripción de morfología macroscópica

Enterobacter cloacae tiene la capacidad de crecer en la mayoría de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de la familia *Enterobacteriaceae*, forma colonias redondas en todos los medios de cultivo después de 24 horas de incubación. Las colonias miden aproximadamente entre 2-3 mm de diámetro, es muy fácil diferenciar a *E. cloacae* por que tiene la capacidad de fermentar la lactosa, sin embargo se



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

considera un fermentador débil de la lactosa que podría requerir mayor tiempo de incubación (< 24horas) para observar la reacción de fermentación.

Un gran porcentaje de las cepas pueden ser mucosas y viscosas y esto puede dificultar el diagnóstico, por que pueden ser fácilmente confundidas con cepas del género *Klebsiella*.

(126,146)



Descripción de morfología microscópica



Enterobacter cloacae es un bacilo gramnegativo que mide 0.6-1µm por 1.2-2 µm y es indistinguible a nivel microscópico de los otras especies que forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*, se pueden observar de 4-6 flagelos peritricos. (126,146)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Enterobacter cloacae es un complejo de seis especies diferentes que solo pueden diferenciarse a través de métodos moleculares, las seis especies que forman el complejo *E. cloacae* son: *E. cloacae*, *E. Asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*. (147)

E. cloacae es una bacteria que puede ser encontrada en una gran diversidad de ambientes, sin embargo se encuentra principalmente en los ambientes terrestres y acuáticos, destacando lugares como el alcantarillado, el agua, el suelo y los alimentos. E,sta especie con frecuencia la encontramos como microbiota del tracto intestinal del ser humano y animales. (148)

Es reconocido como un patógeno nosocomial, que se caracteriza por provocar infecciones en el ser humano como bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, infecciones en piel y tejidos blandos, infecciones en el tracto respiratorio e infecciones intraabdominales. *E. cloacae* esta asociado principalmente a causar problemas en las unidades neonatales dentro de los hospitales. (148,149)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

E. cloacae se caracteriza por ser intrínsecamente resistente a amoxicilina, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina debido a la producción de una betalactamas constitutiva tipo Amp-C, en los últimos años las poblaciones de *E. cloacae* han estado asociadas a la producción de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), incluso hay cepas productoras de Carbapenemas, la producción de cualquiera de las betalactamasas antes mencionadas dificulta el tratamiento y aumenta los periodos de estancia hospitalaria. (147,148)

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa –		Ornitina Descarboxilasa +	
Indol-		Lisina Descarboxilasa –	
VP +		Arginina descarboxilasa +	
Urea +/-		Fermentación Lactosa +	

Factores de virulencia (126,150)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Hemolisina	Sideróforo
Cápsula	Bacteriocinas
Proteasa extracelular	
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Enterobacter aerogenes ATCC® 13048

Descripción de morfología macroscópica

Enterobacter aerogenes después de 24 horas de incubación forma colonias redondas que miden de 2-2.5 mm de diámetro, las colonias pueden ser desde brillosas, o incluso pueden ser opacas muchas de las cepas pueden presentar bordes irregulares.

Las colonias se caracterizan por fermentar la lactosa y en medios diferenciales como Mac Conkey se observan colonias con un coloración ligeramente rosa y muchas cepas aisladas pueden tener un aspecto mucoso similar a los miembros del género *Klebsiella*. (126,146)



Descripción de morfología microscópica



E. aerogenes es similar a nivel microscópico que todos los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos rectos que miden 0.6-1.0 por 1.2-3.0 μm y es indistinguible de cualquier otro género o especie que forme parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria móvil que puede llegar a tener entre 4-6 flagelos peritricos. (126,146)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Enterobacter aerogenes causa enfermedades en humanos a través de la transferencia inadvertida de bacterias en entornos hospitalarios. *E. aerogenes* es oportunista y solo infecta a aquellos que han suprimido las defensas de la inmunidad del huésped. Los bebés, los ancianos y aquellos que se encuentran en las etapas terminales de otras enfermedades o están inmunodeprimidos son los candidatos para adquirir una infección por *E. aerogenes*. (148)

Con frecuencia *E. aerogenes* es aislado de muestras clínicas humanas, principalmente en vías respiratorias, urinarias, sanguíneas y gastrointestinales, otra de las características importantes a resaltar es que *E. aerogenes* se coloca como una de las cepas multiresistentes más importantes a nivel clínico, a diferencia de *E. cloacae*, las cepas de *E. aerogenes* son resistentes a través de la producción de betalactamasas de espectro extendido, hoy en día se pueden llegar a aislar cepas que incluso pueden producir carbapenemasas (151).

E. aerogenes es uno de los microorganismos que generará una de las más grandes discusiones a nivel taxonómico, desde el año de 1971 se ha propuesto su reclasificación a nivel de género debido a su relación genética más cercana con el género *Klebsiella*, en la actualidad la nomenclatura taxonómica de *Enterobacter aerogenes*, ha sido reclasificada y hoy en día se le debe de nombrar a esta especie como *Klebsiella aerogenes* de acuerdo con el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI) ha adoptado este nombre como oficial en sus documentos publicados a partir del año 2018. (148,152)

Pruebas de identificación (70,126)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Oxidasa –		Ornitina Descarboxilasa +	
VP+		Lisina Descarboxilasa +	
Urea-		Arginina Descarboxilasa –	
Citrato +		Fermentación Lactosa +	

Factores de virulencia (126,150)

Hemolisina

Cápsula

Proteasa extracelular

Sideróforo

Bacteriocinas

Métodos de conservación

Crioconservación (Cinco años)

Resiembra continúa (tres años)

Medio de conservación

Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Proteus vulgaris ATCC® 49132

Descripción de morfología macroscópica

Proteus vulgaris se caracteriza por ser un microorganismo no fermentador de la lactosa, las colonias son de tamaño mediano aproximadamente de 2-3 mm de diámetro, son convexas, pueden ser blanquecinas o traslucidas, tienen forma circular, bordes redondeados. En los medios comunes *Proteus* se caracteriza por presentar un fenómeno llamado swarming, este tipo de fenómeno se presenta como una ola alrededor de las colonias bacterianas definidas, la extensión de la ola se presenta de forma radial. La capa de swarming se caracteriza por ser delgada pero homogénea. (126,153)



Descripción de morfología microscópica



Proteus vulgaris es un bacilo gramnegativo que mide 0.4-0.8 μm de ancho por 1.0-3.0 μm de largo, a través de su morfología microscópica es indistinguible de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y de otras especies que pertenecen al género *Proteus*. (126,153)

Epidemiología y aspectos clínicos.

El género *Proteus* se encuentra en el suelo, el agua y en los materiales que han tenido un proceso de contaminación fecal. *P. vulgaris* se recupera más

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

comunmente de sitios infectados en huéspedes inmunocomprometidos, sobre todo los pacientes que reciben regímenes prolongados de antibióticos, las muestras más frecuentes remitidas al laboratorio donde hay mayor probabilidad de encontrar como agente infectante a *P. vulgaris* es tracto urinario y respiratorio, así como objetos contaminados por heces y sangre. (126,154,155)

P. vulgaris es una bacteria oportunista que bajo las condiciones favorables causa infecciones en el tracto urinario y comunmente es asociado a infecciones complicadas, generalmente afecta las vías altas del tracto urinario, causando infecciones como urolitiasis (formación de piedras en el riñon o la vejiga), cistitiis y pielonefritis. Otras infecciones como la septicemia, meningitis e infección de heridas es asociado principalmente a recién nacidos, bebés y pacientes con artritis reumatoide. (154,155)

Pruebas de identificació (70,154)

Oxidasa –



Indol +



RM +



H₂S+

Fenilalanina

Desaminasa +



Urea+



Maltosa+



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

			
Factores de virulencia ^(126,156)			
Fimbrias Flagelos Proteínas de membrana externa Lipopolisacáridos		Cápsulas antigénicas Ureasa Hemolisisnas	
Métodos de conservación		Medio de conservación	
Criopreservación (Cinco años) Resiembración continua (tres años)		Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).	
Temperatura de conservación		Medio de propagación	
-80 °C Criopreservación y 4-8 °C Resiembración continua.		ASC 5% y AST	
Temperatura de incubación		Tiempo de incubación	
37 °C		18-24 horas	

Proteus mirabilis ATCC® 13315

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *Proteus mirabilis* son de tamaño mediano miden de 3-4 mm de diámetro, las colonias pueden ser desde color blanco hasta traslucidas, son convexas de forma circular con sus bordes redondeados, al igual que *Proteus vulgaris* también presenta el fenómeno de swarming, en medios diferenciales como *Salmonella-Shigella* se puede ver la producción de ácido sulfhídrico, las colonias son



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

transparentes irregulares por el fenómeno de swarming, y su centro es de color negro. (126,153)



Descripción de morfología microscópica



P. mirabilis es un bacilo gramnegativo corto que mide 0.4-0.8µm de ancho por 1.0-3.0 µm de largo, es similar a nivel microscópico que cualquier otro microorganismo que pertenezca a la familia *Enterobacteriaceae*, las cepas de *P. mirabilis* son móviles a través de flagelos peritricos. (126,153)

Epidemiología y aspectos clínicos.

P. mirabilis se encuentra en una amplia variedad de entornos, incluido el suelo, las fuentes de agua y las aguas residuales, pero es uno de los microorganismos predominantes que se encuentran como comensales del tracto gastrointestinal de humanos y animales. (155,157)

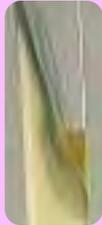
El 90% de las infecciones provocadas por el género *Proteus* se le atribuyen a *P. mirabilis* y la mayoría de ellas son infecciones adquiridas en la comunidad. (158)

Aunque las cepas del género *Proteus* son una causa común de infecciones de origen nosocomial, también se ha demostrado que *P. mirabilis* causa infecciones a partir de piel y mucosas colonizadas ya sea de pacientes o personal de salud.

Las manifestaciones clínicas más comunes de la infección por *P. mirabilis* son las asociadas al tracto urinario, en general las infecciones de tracto urinario se presenta en personas de 20 a 50 años es más común en el género femenino, en mujeres sanas representa el 1% al 2% de las infecciones de tracto urinario, pero puede llegar a representar hasta el 5% de las infecciones urinarias adquiridas en un hospital. La preocupación más grande que despierta *P. mirabilis* es que esta presente en un 20% a 45% de infecciones urinarias complicadas asociadas a la cateterización. (159)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa-		Fenilalanina Desaminasa +	
Indol -		Urea+	
H ₂ S +		Maltosa-	
RM +			

Factores de virulencia (158,159)

Ureasa	Zap metalloproteasa
Proteasas	Hemolisina
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembrada continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Serratia marcescens ATCC® 13315

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *Serratia marcescens* son colonias medianas que miden entre 1.5-2 mm de diámetro, se caracterizan por ser opacas o brillosas y pueden ser blancas o bien estar pigmentadas. El color de la pigmentación puede variar desde rosa hasta un color rojo intenso, la coloración se manifiesta solo si la cepa tiene la capacidad de producir alguno de los dos pigmentos. ⁽¹²⁶⁾

La prodigiosina, es un pigmento de color rojo y es el que se encuentra con mayor frecuencia en la mayoría de estas cepas, este pigmento tiene la capacidad de producir una coloración que puede ir desde naranja, rosa, rojo hasta el manjenta, ⁽¹⁶⁰⁾

La piremina es el segundo pigmento, este es soluble en agua, da una tonalidad rosa y es producido solo por una pequeña cantidad de cepas de *S. marcescens*. Las cepas que no tienen la capacidad de producir ninguno de los dos pigmentos son de color blanco. ⁽¹⁶⁰⁾

La mayoría de las cepas tienen la capacidad de crecer bien en un rango de temperatura que va desde los 10-36 °C.



Descripción de morfología microscópica



Son bacilos rectos gramnegativos con extremos redondeados que miden 0.5-0.8 de ancho por 0.9-2.0 μm de largo, cumple con todas las características a nivel microscópico como un representante de la familia *Enterobacteriaceae* (126,160)

Epidemiología y aspectos clínicos.

Las infecciones humanas causadas por *S. marcescens* fueron reconocidas hasta la segunda mitad del siglo XX e implican un amplia gama de infecciones graves, incluida la neumonía, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones del tracto urinario, del torrente sanguíneo, siendo aislado con mucha mayor frecuencia en heridas y en casos de meningitis (161)

La mayoría de las infecciones que se presentan por *S. marcescens* son de origen nosocomial y se caracteriza por ser un patógeno oportunista, la importancia clínica de este agente etiológico se ha apreciado en las últimas décadas, hay reportes que indican que *S. marcescens* es también un agente que causa raramente infecciones adquiridas en la comunidad pero es realmente relevante como un patógeno nosocomial principalmente asociado a la asistencia sanitaria y una fuente frecuente de brotes de infección hospitalaria, tanto en pacientes adultos como pediátricos. (162,163)

Las infecciones oculares provocadas por *S. marcescens* es una fuente de infecciones adquiridas en el hospital particularmente en recién nacidos y niños, este tipo de infecciones se asocian a un trauma previo, pero se ha comprobado que el traumatismo muchas veces no debe de estar presente para producir cuadros de conjuntivitis, queratoconjuntivitis, endoftalmitis, úlceras corneales y queratitis. (161,162)

Uno de los mayores problemas que representa cualquier infección causada por *S. marcescens* es la dificultad del tratamiento, la mayoría de las cepas son uniformemente resistente, los patrones de resistencia incluyen penicilinas y cefalosporinas de espectro estrecho, cefuroxima, cefamicinas, macrólidos, tetraciclinas, nitrofurantoína y colistina. (162)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa –		Urea –	
VP+		Citrato +	
DNasa 25°C+		Fermentación L-arabinosa –	

Factores de virulencia (164)

Producción de pigmento	Plasmidos que confieren resistencia
Producción de citotoxinas	Resistencia al suero

Métodos de conservación

Crioconservación (Cinco años)	Medio de conservación
Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Temperatura de conservación

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	Medio de propagación
	ASC 5% y AST

Temperatura de incubación

37 °C	Tiempo de incubación
	18-24 horas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Serratia liquefaciens ATCC ® 27592

Descripción de morfología macroscópica

Las cepas de *S. liquefaciens* crecen bien después de 18-24 horas de incubación en la mayoría de los medios de cultivo, desarrollo colonias medianas que pueden llegar a medir entre 2-3 mm de diámetro, las colonias se caracterizan por ser opacas o brillantes y son blancas, no producen ningún tipo de pigmento. (126,160,160)



Descripción de morfología microscópica



S. liquefaciens se observan como bacilos rectos gramnegativos, que tienen los extremos redondeados, pueden medir 0.5-0.8mm de ancho por 0.9-2.0 μm de largo, a nivel microscópico es indistinguible de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. (126,160)

Epidemiología y aspectos clínicos.

S. liquefaciens se aísla con poca frecuencia a partir de muestras clínicas humanas, se considera la segunda especie de *Serratia* aislada con mayor frecuencia, este microorganismo se encuentra en el ambiente y se asocia a infecciones de origen nosocomial, el origen de este tipo de infecciones están relacionadas con dispositivos, productos y equipos médicos contaminados.

La mayoría de los informes asocian a *S. liquefaciens* como agente causal de abscesos, endocarditis, septicemia, meningoencefalitis fatal, artritis séptica, infecciones del tracto urinario y con mucha frecuencia se encuentra en heridas.

(161,165)

Pruebas de identificación (70,126)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Oxidasa –		Urea –	
VP+		Citrato +	
DNasa 25°C V(85)		Fermentación L-arabinosa +	
Métodos de conservación		Medio de conservación	
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)		Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).	
Temperatura de conservación		Medio de propagación	
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.		ASC 5% y AST	
Temperatura de incubación		Tiempo de incubación	
37 °C		18-24 horas	

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Shigella flexneri ATCC ® 9190

Descripción de morfología macroscópica

Las cepas de *S. flexneri* crecen bien alrededor de los 37 °C, generalmente se desarrollan con menos rapidez que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las colonias pueden ser colonias lisas y brillantes o bien ásperas y secas, son colonias redondas, con borde irregular, no hemolíticas. Se caracteriza por ser cepas lactosa negativas cuando son inoculadas en agar MacConkey suelen ser colonias transparentes, en medios como *Salmonella-Shigella* se observan colonias incoloras, con bordes irregulares, algunas cepas pueden tener problemas para desarrollarse en algunos medios selectivos. (126,166)



Descripción de morfología microscópica



Son bacilos rectos gramnegativos que miden 0.7-1.0 de diámetro por 1-3 de largo y se ajustan a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae*, es un microorganismo que no cuenta con motilidad por lo tanto no hay presencia de flagelos. (126,166)

Epidemiología y aspectos clínicos.

El género *Shigella* comparte características comunes con los miembros del género *Escherichia* y la relación genética sugiere que es un subtipo de *E. coli*. El género *Shigella* se divide en cuatro serogrupos que representan cuatro especies distintas, las cepas son inertes a nivel bioquímico y es necesario la serotipificación para la identificación correcta de cualquiera de las especies. Con pruebas bioquímicas solo se puede llegar a la descripción solo a nivel de género. Las cuatro especies de *Shigella* son agentes causales de diarrea bacteriana en todo el mundo, en especial en países en vías de desarrollo, una de las características más importantes del género *Shigella* es que puede sobrevivir al

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

tránsito estomacal, la propiedad que les confiere resistencia a las cepas de *Shigella* es su menor susceptibilidad al efecto del ácido gástrico y es por esta misma razón que las cepas de *Shigella* requiere una menor cantidad de microorganismos como dosis infectiva. La dosis puede oscilar entre 10 a 100 microorganismos para poder desarrollar la enfermedad. (167,168)

La disentería debido a especies de *Shigella* es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, se calcula que al año se registran 165 millones de casos en todo el mundo con un millón de muertes asociadas. La transmisión puede ocurrir de manera directa (de persona a persona) o a través de alimentos y agua contaminada. En países desarrollados los casos de shigelosis son más comunes en las guarderías, en lugares donde se presente el hacinamiento como puede ser colegios, hospitales, hogares de ancianos y centros de entretenimiento, normalmente la shigelosis en países desarrollados se caracteriza por generar pequeños brotes infecciosos. (168,169)

Una fuente principal por la cual es transmitida las shigelosis es a través de la contaminación alimentaria principalmente se asocia a ensaladas frías. En la mayoría de los casos estos alimentos presuntamente fueron contaminados por las mismas personas que se encargaron de la preparación de los alimentos y que están asociados a una enfermedad reciente. Otro de los motivos es la baja calidad de los alimentos, la contaminación fecal se da durante el periodo de cultivo de vegetales crudos y sobresalen como ejemplos claros la lechuga y los tomates. (170)

Hoy en día una de las formas de transmisión que ha tomado mayor relevancia en los casos de shigelosis es la transmisión sexual. Se han reportado brotes de shigelosis entre hombres que tienen sexo con hombres. La población que tiene mayor probabilidad de contraer shigelosis por transmisión sexual está asociado a una coinfección de VIH y contacto directo anal-oral. (171,172)

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

En los países en vías de desarrollo la shigelosis está asociada a la inadecuada eliminación de aguas residuales, a la transmisión de persona a persona a través de la contaminación fecal-oral, que se ve aumentada por la falta de higiene y el contacto estrecho con otros individuos. (169,170)

La Shigelosis en los países en vías de desarrollo se presenta con mayor frecuencia en niños menores de cinco años de edad (69% de todos los casos), se asocia a la falta de agua potable, saneamiento deficiente, desnutrición y el alto costo del tratamiento con antibióticos. Es importante resaltar que en ausencia de un tratamiento efectivo para los pacientes con shigelosis pueden desarrollar complicaciones secundarias como septicemia, neumonía y síndrome urémico hemolítico. Las especies de *Shigella* se caracterizan por invadir el epitelio del área del colón y del recto de los primates y humanos, la invasión causa una inflamación aguda de la mucosa. La infección generalmente se limita a la capa superficial de la mucosa colónica, que puede ocasionar daño tisular severo ocasiona abscesos y ulceración. La destrucción de la capa epitelial conduce a los síntomas clínicos de diarrea acuosa, dolor abdominal severo y calambres, todos estos síntomas se manifiestan a través de heces mucoides, sanguinolentas característica de la disentería bacilar. (173,174)

Pruebas de identificación (70,126)

Oxidasa -		Fermentación del manitol +	
Urea -		Indol -/+	

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



Factores de virulencia (175)	
Lipopolisacárido Enterotoxinas Sideróforos	Conversión y modificación de antígeno O Toxina Shiga
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853

Descripción de morfología macroscópica

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Las morfologías coloniales de las cepas de *P. aeruginosa* suelen ser muy polimórficas, pero resaltan tres tipos de morfologías colonias que tienen variantes pero en términos generales se pueden clasificar todas las cepas dentro de alguna de ellas.

Las colonias pueden ser grandes, lisas, con bordes planos y centro elevado con apariencia de huevo frito, se pueden llegar a ver de color gris, con tonalidades metálicas que asemejan escamas de pescado. La segunda morfología que se presenta con mayor frecuencia son colonias pequeñas convexas y rugosas, este tipo de morfología está asociado a aislados de origen ambiental, el tercer tipo de colonias se asocian por ser aisladas a partir de secreciones respiratorias y en el tracto urinario, se caracterizan por ser colonias mucoides. En agar sangre las colonias de *P. aeruginosa* producen beta hemólisis, algunas cepas producen ciertos pigmentos hidrosolubles y difusibles. Dentro de estos pigmentos se incluyen la fluoresceína (Pioverdina), piocianina, piorrubina y melanina. (176,177)



Descripción de morfología microscópica



Son bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvos, pero no helicoidales, pueden medir de 0.5-1.0 μm de ancho por 1.5-5.0 μm de largo, son microorganismos móviles por un solo flagelo polar. (176,177)

Epidemiología y aspectos clínicos.

P. aeruginosa es uno de los microorganismos que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas. La versatilidad y localización ubicua por parte de *P. aeruginosa* lo convierte en el patógeno oportunista por excelencia que tiene la

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

capacidad de causar infecciones agudas o crónicas potencialmente mortales, particularmente en pacientes cuya defensa inmune se encuentre comprometida. Se caracteriza por ser un patógeno común en los pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplante de órganos y pacientes con alguna adicción a drogas intravenosas. (178,179)

Las infecciones de *P. aeruginosa* suelen ocurrir en sitios anatómicos que tienen grandes acumulaciones de humedad ejemplos de estos sitios son las traqueostomías, catéteres permanentes, quemaduras, el oído externo y heridas cutáneas. Hay otros sitios de infección como los ojos donde se puede presentar como infecciones serias, los casos que se presentan con mayor frecuencia son la queratitis, la infección de úlceras corneanas y endoftalmitis, estas infecciones deben de tratarse como emergencias médicas que pueden provocar la pérdida permanente de la visión. Los casos de infecciones como la endocarditis, meningitis, abscesos encefálicos e infecciones de huesos y articulaciones se encuentran cada vez con mayor frecuencia. (180,181)

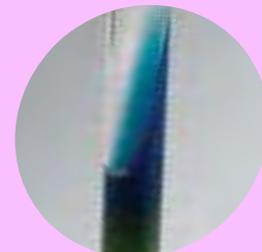
La identificación microbiológica es muy sencilla para *P. aeruginosa* sin embargo cada día los aislados de este microorganismo son más difíciles de tratar debido a que esta especie de bacteria es naturalmente resistente a muchos antibióticos y hay un gran número de cepas que son resistentes a casi todos los tipos de antibióticos de uso común, incluidos aminoglucosidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos. (182,183)

Pruebas de identificación (70,176)

Oxidasa +



Acetamida +



Nitratos +

Manual para la Identificación y la conservación microbiana



Factores de virulencia ⁽¹⁸⁴⁾	
Pili tipo IV Flagelo Lipopolisacáridos Producción de biofilm	Producción de Alginato Elastasa Exotoxina tipo A
Métodos de conservación	Medio de conservación
Crioconservación (Cinco años) Resiembra continúa (tres años)	Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).
Temperatura de conservación	Medio de propagación
-80 °C Crioconservación y 4-8 °C Resiembra continúa.	ASC 5% y AST
Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
37 °C	18-24 horas

Pseudomonas fluorescens ATCC® 13525

Descripción de morfología macroscópica

Las colonias de *P. fluorescens* son colonias medianas, circulares de aspecto liso, con contorno circular, convexas y pueden ser opacas o brillosas, desarrollan este aspecto a las 24 horas de incubación.

Las colonias cuando tienen un periodo mayor de 24 horas comienzan a extenderse, formando colonias con una superficie lisa y bordes irregulares. Se caracteriza por tener una temperatura óptima de crecimiento entre 25-30 °C,



Manual para la Identificación y la conservación microbiana

produce un pigmento fluorescente (fluoresceína), la cual puede evidenciarse al hacerla reacción frente a luz ultravioleta. (176,177)

Descripción de morfología microscópica



Son bacilos rectos o ligeramente curvados gramnegativos, tienen una longitud 1.5-5.0 μm de largo por 0.5-1.0 μm de ancho, es móvil a través de flagelos polares (tiene más de uno), es imposible diferenciar las cepas de *P. fluorescens* de otras especies de *Pseudomonas spp.* a través de su morfología microscópica. (176,177)

Epidemiología y aspectos clínicos.

En los últimos años se ha puesto en evidencia una de las características más importantes que posee *P. fluorescens* se ha identificado como un miembro de baja abundancia de la microbiota autóctona de diversas partes del cuerpo, incluyendo la boca, el estómago y los pulmones. *P. fluorescens* generalmente ha sido considerado un no patógeno para los seres humanos, sin embargo, aunque es mucho menos virulenta que las cepas de *P. aeruginosa*, puede causar infecciones agudas (oportunistas) en humanos. El sitio más común donde causa infección *P. fluorescens* es en el torrente sanguíneo, la mayoría de los casos notificados en este sitio han sido de origen iatrogénico y la gran parte de bacteremias se puede atribuir a la transfusión de hemoderivados contaminados o al uso de equipos contaminados asociados con infusiones intravenosas. Hay otros sitios donde se han reportado infecciones producidas por *P. fluorescens* como los son en tejido óseo, LCR, en los ojos, pulmón, tracto urinario y heridas de piel. (185,186)

La utilidad de *P. fluorescens* y su enorme potencial de ser una bacteria asociada a las plantas como un agente estimulante del desarrollo y la sanidad de las mismas. Hoy en día a este tipo de bacterias como *P. fluorescens* se les conoce como bacterias biocontroladoras promotoras del crecimiento o bien como

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

bacterias estimuladoras del crecimiento en plantas. La gran característica de *P. fluorescens* para favorecer el crecimiento de la planta es su propio metabolismo (solubilidad de fosfatos, producción de hormonas y la fijación de nitrógeno). La utilidad de *P. fluorescens* como estimulador del crecimiento en plantas, impactará la industria agrícola a través de la sustitución de los abonos químicos, que además de ser costosos dañan el medio ambiente, reduciendo los costos para la producción de vegetales para consumo humano. (187,188)

Pruebas de identificación (70,176)

Oxidasa +



Nitratos +



Acetamida -



Métodos de conservación

Crioconservación (Cinco años)
Resiembra continúa (tres años)

Medio de conservación

Caldo Soya Trypticaseína + Leche descremada (20%) + Glicerol (20%).

Temperatura de conservación

-80 °C Crioconservación y 4-8 °C
Resiembra continúa.

Medio de propagación

ASC 5% y AST

Temperatura de incubación

37 °C

Tiempo de incubación

18-24 horas

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

Bibliografía

1. Pommerville J. Fundamentals of Microbiology. 10th ed. Boston: Jones & Bartlett; 2011.
2. Sumbali G, Mehrotra R. Principles of Microbiology. 1st ed. New Delhi: McGraw-Hill; 2009.
3. Brock. Biología de los Microorganismos. 12th ed.: Pearson Educación; 2009.
4. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9th ed. Buenos Aires : Médica Panamericana; 2007.
5. Glansdorff N, Xu Y, Labedan B. The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biology Direct*. 2008 Julio; 3(29).
6. Weiss M, Sousa F, Mrnjavac N, Neukirchen S. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology*. 2016 Jun.
7. Forterre P, Gribaldo S, Brochier C. Luca: À la recherche du plus poche ancêtre commun universel. *Médecine/sciences*. 2005 octobre ; 21(10): p. 860-865.
8. Woese C, Fox G. The concept of cellular evolution. *Molecular Evolution*. 1977 Mar; 10(1): p. 1-6.
9. Kolter R, Maloy S. *Microbes and Evolution: The World That Darwin Never Saw*. 1st ed.: Kolter R, Maloy SE. Microbes and Evolution. American Society of Microbiology; 2012. ; 2012.
10. Brenner D, Krieg NR , Staley G. *BERGEY'S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. 2nd ed. Michigan : Springer.
11. García R, Picazo J. *Compendio de Microbiología Médica*. 1st ed. Madrid: Harcourt.
12. Tindall B, Rosello R, Busse H, Ludwig W. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;(60): p. 249-266.
13. Rainey F, Oren A. *Methods in Microbiology/Taxonomy of Prokaryotes*. 1st ed. London: Elsevier.
14. Cohan F. What are Bacterial Species? *Annual Review of Microbiology*. 2002;(56): p. 457-487.
15. Konstantinidis K, Ramette A, Tiedje J. The bacterial species definition in the genomic era. *PHYLOSOPHYCAL TRANSACTIONS*. 2006;(361): p. 1929-1940.
16. American Type Culture Collection. American Type Culture Collection. [Online].; 2010 [cited 2017 09. Available from: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb01.ashx>.
17. Koneman W, Winn W, Allen S, Procop G. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color/ Elmer W. Koneman*. 6th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana ; 2008.

18. American Society for Microbiology. Internacional Code of Nomenclature of Bacteria Washington DC : American Society for Microbiology; 1992.
19. American Type Culture Collection. Microbiology resources. [Online].; 2013 [cited 2017 09. Available from: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb06.ashx>.
20. Brown R, Gilbert P. Microbiological quality assurance: a guide towards relevance and reproducibility of inocula. 1st ed. Florida : CRC Press LLC; 2000.
21. American Society Microbiology. American Society Microbiology. [Online]. [cited 2017 11. Available from: <https://www.asm.org/index.php/choma3>.
22. Sanchez R, Oliva O. Historia del microscopio y su repercusión en la Microbiología. HumanidadesMédicas. 2015 May; 14(02).
23. Molina I, Acuña V, Gutiérrez J, Jaramillo J. Balances del siglo XX: historia, microbiología, medicina y física. 1st ed. San José: Universidad de Costa Rica; 2004.
24. Barton H. Introduction to Cave Microbiology: A Riview for the Non- Specialist. Journal of Cave And Karst Studies. 2006 Aug; 68(02): p. 43-54.
25. Uruburu F. History and services of culture collections. International Microbiology. 2003 Jun; 6(2): p. 101-103.
26. Smith D. Culture collections over the world. International Microbiology. 2003 Dec; 6(2).
27. Canovas M, Iborra J. Culture collections and biochemistry. Internarional Microbiology. 2003; 06(02).
28. Canhos V, Manfio G. Microbial Resource Centres and Ex-Situ Conservation. 1st ed. Priest : Springer; 2000.
29. Lindsay I. Biodiversity and the Role of Microbial Resource Centres. 2010.
30. Kocur M. History of the Král collection. International House. 1990.
31. World Federation for Cultures Collections. WFCC. [Online].; 2017 [cited 2017 10. Available from: <http://www.wfcc.info/about/>.
32. World Data Centre For Microorganisms. WFCC. [Online].; 2011 [cited 2017 12. Available from: <http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/home/statistics/#m2>.
33. World Data Center of Microorganisms. World Data Center of Microorganisms. [Online].; 2011 [cited 2017 12. Available from: http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/m/52/.
34. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
35. Kumar S, Kashyap P, Singh R, Srivastava A. Preservation and Maintenance of Microbial Cultures. In Kumar D, Das S, Sukumar M. Analyzing Microbes/Manual of Molecular Biology Techniques.: Springer ; 2013.
36. Heckly R. Preservation of Microorganisms. Advances in Applied Microbiology. 1978; 24.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

37. Hartsell S. The Preservation of Bacterial Cultures under Paraffin Oil. *Applied and Environmental Microbiology*. 1953 Jan;; p. 36-41.
38. Smith R. Preservation of Certain Microorganisms Under Paraffin Oil. *Journal of Bacteriology*. 1947 Jan.
39. Hartsell S. The longevity of Bacterial Cultures Under Parraf. 1947 Jun; 53(6).
40. Harbec P, Turcotte P. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20°C. *Journal of Clinical Microbiology*. 05 1996; 34(5): p. 1143-1146.
41. Hubalek Z. Loss of viability and metabolic injury of *Staphylococcus aureus* resulting from storage at 5°C. *Journal of Applied Bacteriology*. 1979; 46: p. 173-177.
42. Morgan C, Herman N, White P, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiology Methods*. 2006; 26: p. 183-193.
43. Khursheed A, Claus M, Claus D. Bacterial Cultrure Collections: Their Importance to Biotechnology an Microbiology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1987 Apr; 5(1): p. 137-198.
44. Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses*. 1998 Aug; 41: p. 255-257.
45. MacGinnis M, Padhye A, Ajello I. Storage of Stock Cultures of Filamentous Fungi, Yeasts and Some Aerobic Actinomycetes in Sterile Distilled Water. *Applied Microbiology*. 1974 Aug; 28(2).
46. Morris G. *Cryopreservation/An Introduction to cryopreservation in culture collection*. 1st ed. Cambridge: Cambrian News; 1981.
47. Gherna R, Reddy C. Culture Preservation. In Reddy C, Beveridge T, Breznak J, Marzluf G, Schmidt T. *Methods for General and Molecular Microbiology*. Whashington DC: ASM Press; 2007.
48. Mazur P, Leibo S, Chu E. A Two-Factor Hypothesis of Freeing Injury. *Experimental Cell Research*. 1972; 71: p. 345-355.
49. Pegg D. Principles of Cryopreservation. In Walker J, Oldenhof H. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocolos*. 3rd ed. New York : Humana Press p. 3-19.
50. Simione F. Key Issues Relating to the Genetic Stability and Preservation of Cells and Cell Banks. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 1992.
51. Mazur P. Physical Factors Implicated in the Death of Microorganisms at Subzero Temperatures. *ANNALS of the New York Academy of Sciences*. 1960 Apr; 85.
52. Tedeschi R, De Paoli P. Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. In Dillner J. *Methods in Biobanking*. Estocolmo: Humana Press; 2011.
53. ASTM E-134297 (2002). Standard Practice for Preservation by Freezing, Freeze-Drying, and Low Temperature Maintenance of Bacteria, Fungi,

- Protista, Viruses, Genetic Elements, and Animal and Plant Tissues. ASTM International. 1997.
54. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*. 2003; 46.
 55. Meryman H. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1971 Apr; 8(2).
 56. Lovelock J, Bishop M. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature*. 1959; 183.
 57. Meryman H, Williams R, Douglas M. Freezing Injury from "Solution Effects" and its Prevention by Natural or Artificial Cryoprotection. *Cryobiology*. 1977; 14: p. 287-302.
 58. Lapage S, Shelton J. Culture Collections and the Preservation of Bacteria. In *Microbiology Mi..*
 59. Alonso S. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. In Ojha K, Tiwari B. *Novel Food Fermentation Technologies*. Cork: Springer; 2016.
 60. Adams G, Cook I, Ward K. The principles of Freeze-Drying. In Wolkers F, Oldenhof H. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Hannover: Humna Press; 2015.
 61. Benedict R, Corman J, Sharpe E, Kemp C, Jackson R. Preservation of Microorganisms by Freeze-Drying. *Applied Microbiology*. 1958 Nov; 6(6).
 62. American Type Culture Collection. ATCC. [Online].; 2017 [cited 2017 11. Available from: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb06.ashx>.
 63. U.S Pharmacopeia. U.S Pharmacopeia. [Online].; 2013 [cited 2017 11. Available from: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c51.html.
 64. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
 65. Heinz K, Bell JA. Staphylococcaceae. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W. *The Firmicutes*. Athens: Springer; 2009.
 66. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G. Cocos gram positivos, Parte I: Estafilococcus y cocos grampositivos relacionados. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G. *Koneman Diagnóstico Microbiológico/Texto y Atlas*. Buenos Aires : Médica Panamericana; 2008. p. 593-638.
 67. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland T, Fowler Jr G. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015 Jul; 28(03): p. 603-661.
 68. Paterson G, Harrison E, Holmes M. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Trends in Microbiology*. 2014 Jan; 22(1): p. 42-47.
 69. Chambers H, DeLeo F. Waves of resistance: Staphylococcus aureus. *Nature Reviews Microbiology*. 2009 Sep; 7: p. 629-641.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

70. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Buenos Aires: Médica Panamericana ; 2004.
71. Otto M. Staphylococcus epidermidis - the "accidental" pathogen. Nature reviews Microbiology. 2009 Aug; 7.
72. Grice E, Segre J. The skin microbiome. Nature reviews microbiology. 2011 Mar; 9.
73. Gomes F, Teixeira P, Oliveira R. Mini-review: Staphylococcus epidermidis as the most frequent cause of nosocomial infections old and new fighting strategies. Biofouling. 2013 Nov 28; 11(08).
74. Jürgen H. Micrococcales. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H, Trujillo M, Suzuki K. BERGEY'S MANUAL ® OF Systematic Bacteriology. Athens: Springer p. 569-576.
75. Bannerman T, Peacock S. Staphylococcus, Micrococcus and Other Catalase-Positive Cocci. In Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 390-411.
76. Wieser M, Denner E, Kämpfer P, Schumann P, Tindall B, Steiner U. Emended descriptions of the genus Micrococcus, Micrococcus luteus (Cohn 1872) and Micrococcus lylae (Kloos et. al. 1974). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002; 52: p. 629-637.
77. Seifert H, Kalthener M, Remington F. Micrococcus luteus endocarditis: Case report and review of the literature. Zentralblatt für Bakteriologie. 1995 Oct; 282(4): p. 431-435.
78. Whaley R, Hardie J. Streptococcaceae. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ledwig W. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology "The Firmicutes". Athens: Springer ; 2009. p. 655-711.
79. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. Cocos grampositivos Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias "similares a Streptococcus". In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. Buenos Aires : Médica Panamericana ; 2006.
80. Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews. 2002 Oct; 15(04): p. 613-630.
81. Walker M, Barnett T, McArthur J, Cole J, Gillen C. Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A Streptococcus. Clinical Microbiology Reviews. 2014 Apr; 27(02): p. 254-301.
82. Vornhagen J, Waldorf K, Rajagopal L. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity and Prevention Strategies. Trends in Microbiology. 2017 Nov; 25(11).
83. Crespo P, Castañeda C, Recalde M, Velez J. Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of Streptococcus agalactiae in a Latin American Hospital: a 17-year study. BMC Infectious Diseases. 2014 Aug; 14.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

84. Sambola A, Miro J, Tornos M, Almirante B, Moreno-Torrico A. Streptococcus agalactiae Infective Endocarditis: Analysis of 30 cases and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*. 2002 Jun; 34(12).
85. Loesche W. Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*. 1986 Dec; 50(4).
86. Doern C, Burnham C. It's Not easy Being Green: the Viridans Group Streptococci with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. *Journal Clinical Microbiology*. 2010 Nov; 48(11).
87. Coykedall A. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1989 Jul; 2(3).
88. AlonsoDeVelasco E, Verhuel A, Snippe H. Streptococcus pneumoniae: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1995; 59(04).
89. Gray B, Musher D. The History of Pneumococcal Disease. In Siber G, Klugman K, Mäkelä P. *Pneumococcal Vaccines: The Impact of Conjugate Vaccine*. Washington, DC: ASM PRESS; 2008.
90. Henriques-Normark B, Tuomanen E. The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013 Jul; 3(07).
91. Ludwig W, Scheleifer KH, Whitman W. Enterococcaceae. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology "The Firmicutes"*. Athens : Springer ; 2009.
92. Vu J, Carvalho J. Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the changes it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology*. 2011 Oct; 6(5).
93. Arias C, Murray B. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Microbiology Reviews*. 2012 Apr; 10.
94. Girindhara Upadhyaya P, Ravikumr K, Umapathy B. Review of virulence factors on enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian journal of Medical Microbiology*. 2009; 27(04): p. 301=305.
95. Bernard K, Funke G. Genero Corynebacterium. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H, Trujillo M, Susuki K, Ledwing W, et al. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology*. Athens.
96. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. Bacilos grampositivos aerobios y facultativos. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. Buenos Aires : Médica Panamericana.
97. Murphy J. Corynebacterium Diphtheriae. In Baron S. *Medical Microbiology*. Galveston: University of Texas Medical Branch; 1996.
98. Funke G, Graevenitz A, Clarridge III J, Bernard K. Clinical Microbiology of Corynebacterium Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997 Jan; 10(01).

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

99. Both L, Collins S, Zoysa A, White J, Mandai S. Molecular and Epidemiological Review of Toxigenic Diphtheria Infections in England between 2007 and 2013. *Journal Clinical Microbiology*. 2014 Dec; 53(02).
100. Lortholary O, Buu-Hoi A, Fagon J, Pierre J, Slama M, Gutmann L, et al. Mediastinitis Due to Multiply Resistant *Corynebacterium xerosis*. *Clinical Infectious Diseases*. 1993 Jan.
101. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. Actinomicetos aerobios. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires : Médica Panamericana.
102. Jones A, Goodfellow M. *Rhodococcus*. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo M, Susuki K. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology "The Actinobacteria"*. Athens : Springer; 2012.
103. Kendlaya I, Wong M, Wong S. *Rhodococcus equi* Infections in Immunocompetent Hosts: Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2001 Feb; 32(3).
104. Prescott J. *Rhodococcus equi*: an Animal and Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991 Jan; 4(01).
105. Le T, Cash-Goldwasser S, Vinh Tho P, Huong Lan N, Campell J. Diagnosing *Rhodococcus equi* Infections in a Setting Where Tuberculosis Is Highly Endemic: a Double Challenge. *Journal Clinical Microbiology*. 2015 Jan; 53(04).
106. Logan N, De Vos P. Genus *Bacillus*. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ledwing W, Rainey F. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology "The Firmicute"*. Athens: Spirnge; 2009. p. 21-128.
107. Bottone E. *Bacillus cereus*, a Vola tile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010 Apr; 23(02).
108. Fermanian C, Fremy J, Lahellec C. *Bacillus cereus* Pathogenicity: A Review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 1993 Jul.
109. Arnesen L, Fagerlund A, Granum P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008 Jul; 32(04).
110. Drobniowski F. *Bacillus cereus* and Related Species. *Clinical MicrobiologyReviews*. 1993; 06(04).
111. Keim P, Walker D, Zilinskas R. Time to Worry About Anthrax Again. *Scientific American*. 2017 Apr.
112. Spencer R. *Bacillus anthracis*. *Journal Clinical Pathology*. 2003; 56: p. 182-187.
113. Missiakas D, Scheewind O. Assembly and Function of the *Bacillus anthracis* S-layer. *Annual Review of Microbiology*. 2017 Sep; 71.
114. Wolfgang J. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific funtions. *Molecular Microbiology*. 2005; 56(04): p. 845=857.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

115. Shahchraghi S, Ayatollahi J, Lotfi M. Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life. *Tropical Journal Of Medical Research*. 2015; 18(1): p. 1-4.
116. Doi R. Genetic Engineering in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Generic Egeineering Reviews*. 1984; 2(1).
117. van Dijk J, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*. 2013 Jan; 12(03).
118. Hammes W, Hertel C. Genus *Lactobacillus*. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey F. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology "The Firmicutes"*. Athens : Springer ; 2009. p. 465-511.
119. Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and comercial success. *FEMS Microbiology letters*. 2013 Dec; 349(2).
120. Sanders M, Klaenhammer T. Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *American Dairy Science Association*. 2001; 84: p. 319-331.
121. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Bacterias anaerobias*. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana ; 2007.
122. Rainey F, Hollen B, Small A. Genus *Clostridium*. In De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology "The Firmicutes"*. Athens : Springer ; 2009.
123. Kornbluth A, Danzing J, Bernstein L. *Clostridium* Infection and Associated Malignancy, Report of 2 cases and review of the literature. *Medicine*. 1989 Jan; 68(01).
124. Wikoff W, Anfora A, Liu J, Schultz P, Peters E, Siuzdak G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academic of Sciences of United States of America*. 2009 Mar 10; 106(10).
125. Stam C. NCSU Libraries. [Online].; 2008. Available from: <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/3192>.
126. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Enterobacteriaceae*. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Koneman Diagnóstico microbiológico/ Texto y Atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
127. Scheutz F, Strockbine N. *Escherichia*. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology Vol. II "The Proteobacteria" Part B "The Gammaproteobacteria"*. Michigan : Springer p. 607-624.

128. Croxen M, Law R, Scholz R, Keeney K. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013 Oct; 26(4).
129. Rodriguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*. 2002 Sep.
130. Farfán-García A, Ariza-Rojas S, Vargas-Cárdenas A. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*. 2016; 33(04).
131. The Center for Food Security & Public Health. The Center for Food Security & Public Health. [Online].; 2010. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli_enterohemorrhagica.pdf.
132. Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K. Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*. 2012.
133. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic ESCHERICHIA COLI. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*. 2004 Feb; 02.
134. Popoff M, Le Minor L. Genus Salmonella. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S OF Systematic Bacteriology Vol II "The Proteobacteria" PartB "The Gammaproteobacteria"*. Michigan: Springer.
135. Crump J, Sjölund-Kirisson M, Gordon M, Parry C. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015 Oct; 28(04).
136. Shu-Kee , Pusparajah P, Nurul-Syakima A, Hooi-Leng S, Kok-Gan , Learn-Han L. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 2015; 08(05).
137. Brenner F, Villar , Tauxe R, Angulo F, Swaminathan B. Salmonella Nomenclature. *Journal Clinical Microbiology*. 2000 Jul; 38(07).
138. Lamas A, Miranda J, Regal P, Vazquez B, Franco C, Cepeda A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica. *Microbiological Research*. 2018; 206.
139. Ibarra J, Steele-Mortimer O. Salmonella- the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiology*. 2009 Nov; 11(11).
140. Grimont P, Grimont F. Genus Klebsiella. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology Vol. II "Proteobacteria" Part B "The Gammaproteobacteria"*. Michigan : Springer.
141. Paczosa M, Meccas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016 Sep; 80(03).
142. Dorman M, Short F. Genoma Watch: Klebsiella pneumoniae: when a colonizer turns bad. *Nature Reviews Microbiology*. 2017; 13.

Manual para la Identificación y la conservación microbiana

143. Poschun R, Ullman U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998 Oct; 11(04).
144. Du P, Zhang Y, Chen C. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017 Nov; 18(01).
145. Clegg S, Murphy C. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*. : p. 1-17.
146. Grimont P, Gromont F. Genus XII. *Enterobacter*. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology Volumen II "The Proteobacteria" Part B "The Gammaproteobacteria"*. Michigan : Springer p. 661-669.
147. Mezzatesta M, Gona F, Stegani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2012 Jul; 7(7).
148. Davin-Regli A, Pages J. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015 May; 6.
149. Bonadio , Margolis D, Tovar M. *Enterobacter cloacae* bacteremia in children: a review of 30 cases in 12 years. *Clinical Pediatrics*. 1991; 30(5).
150. Hussain M, Almmar M. Molecular study of some virulence factors encoding genes of *Enterobacter* spp. Isolated from different clinical specimens. *Magazin of Al-Kufa University for Biology*. 2013; 5(2).
151. Sanders W, Sanders C. *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised to Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997 Apr; 10(10).
152. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
153. Penner J. Genus XXIX. *Proteus*. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology Vol. II "The Proteobacteria" Part "The Gammaproteobacteria"*. Michigan : Springer ; 2007. p. 745-753.
154. Mohammed G, Kadhim M, Hammed I. *Proteus* species. Characterization and Herbal Antibacterial. A Review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2016 Nov; 8(11).
155. O'Hara C, Brenner F, Miller J. Classification, Identification and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000 Oct; 13(4).
156. Rozalki A, Sidorchuk Z, Kotelko K. Potential Virulence Factors of *Proteus* Bacilli. *Micorbiology And Molecular Biology Reviews*. 1997 Mar; 61(1).
157. Armbruster , Mobley H. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 2012 Nov; 10.
158. Armbruster , Moblley H, Pearson M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*. 2018 Feb; 08(01).
159. Jacobsen S, Shirriff M. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*. 2011 May; 02(05).

160. Grimont F, Grimont P. Genus XXXIV "Serratia". In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL*® OF Systematic Bacteriology Vol. II "The Proteobacteria" Part B "The Gammaproteobacteria". Michigan : Springer ; 2008. p. 799-811.
161. Manlen S. Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011 Oct; 24(04).
162. Herra C, Falkiner F. Serratia marcescens. *Antimicrobe*. 2008 Nov.
163. Yu V. Serratia marcescens: Historical Perspective and Clinical Review. *The New England Journal of Medicine*. 1979 Apr.
164. Carbonell G, Della Colleta H, Yono T, Darini , Levy C, Fonseca B. Clinical relevance and virulence factors of pigmented Serratia marcescens. *Immunology and Medical Microbiology*. 200 Feb.
165. Grohskopf L, Roth VR , Feikin D. Serratia liquefaciens Bloodstream Infections From Contamination of Epoetin Alfa at a Hemodialysis Center. *The New England Journal of Medicine*. 2001 May; 344(20).
166. Strokebine N, Maurelli A. Genus XXXV. Shigella. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL*® OF Systematic Bacteriology Vol. II "The Proteobacteria" Part B "The Gammaproteobacteria". Michigan: Springer; 2008. p. 811-823.
167. Jennison A, Verma N. Shigella flexneri Infection pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004 Feb; 28(01).
168. Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K. Shigellosis: A conformity review of Microbiology, Pathogenesis and Epidemiology with consequence for Prevention and Management issues. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*. 2018 Mar; 01(05).
169. Abu I, Syeda U, Hasan A, Mohammad S. Changing Trends in the Prevalence of Shigella Species: Emergence of Multi-Drug Resistant Shigella sonnei Biotype g in Bangladesh. *PLOS ONE*. 2013 Dec; 8(12).
170. Anderson M, Sansonetti P, Marteyn B. Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016 Apr; 6(45).
171. Aragon T, Vugia D, Shallow S, Samuel M. Case-Control Study of Shigellosis in San Francisco: The role of Sexual Transmission and HIV Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2007 Feb; 44(03).
172. Baer J, Vugia D, Reingold A, Aragon T. HIV Infection as a Risk Factor for Shigellosis. *Emerging Infectious Diseases*. 1999 Nov; 05(06).
173. Tickell K, Brander R, Atlas H, Pernica J. Identification and management of Shigella infection in children with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017 Dec; 05.
174. Schroeder G, Hilbi H. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008 Jan; 21(01).

175. Mattock E, Blocker A. How Do the Virulence Factors of Shigella Work Together to Cause Disease? *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*. 2017 Mar; 07(64).
176. Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. Bacilos gramnegativos no fermentadores. In Koneman E, Winn W, Allen S, Procop G, Schreckenberger P. *Koneman Diagnóstico microbiológico "Texto y Atlas en color"*. Buenos Aires : Médica Panamericana ; 2007. p. 289-371.
177. Palleroni N. Genus I Pseudomonas. In Brenner D, Krieg N, Staley J. *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology Vol. II "The Proteobacteria"*. Michigan: Springer ; 2008. p. 323-379.
178. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. Infection Epidemiology & Microbiology*. 2016; 02(01).
179. Hoang A, Georget A, Asselineau J, Venier AG. Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. *PLOS ONE*. 2018 Mar.
180. Cross A, Allen J, Burke J, Duce G, Harris A. Nosocomial Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa* Review of Recent Trends. *Reviews of Infectious Diseases*. 1983 Nov; 05(05).
181. Moradali M, Ghods S, Rehn B. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017 Feb; 07(39).
182. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 2009.
183. Lister P, Wolter D, Hanson N. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009 Oct; 22(04).
184. Veessenmeyer J, Hauser A, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit Care Med*. 2009 May; 37(05).
185. Scales B, Dickson R, LiPuma J, Huffnagle G. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014 Oct; 27(04).
186. Nishimura T, Hatorri K, Inoue A, Ishii T, Yumato T, Tsukahara K. Bacteremia or pseudobacteremia? Review of *Pseudomonas fluorescens* infections. *World Journal of Emergency Medicine*. 2017; 08(02).
187. Pérez S, Coto O, Echemendía M, Ávila G. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿Control biológico o patógeno? *Revista de Protección Vegetal*. 2015; 30(03).
188. Ganeshan G, Manoj A. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*. 2005 Apr; 01(03).

DISCUSIÓN

La realización del presente manual surgió como necesidad por parte del Laboratorio de Producción Microbiológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, para dar a conocer los métodos que emplea, para la conservación de su acervo biológico, es de vital importancia dar a conocer las técnicas utilizadas y disponibles que hay para la conservación de bacterias.

La conservación de microorganismos hoy en día se ha convertido en un tema principal, desde el punto de vista industrial, epidemiológico y con fines de investigación. Los microorganismos que pueden ser almacenados y conservados dentro de un cepario están determinados por el nivel de equipamiento con el que cuente el laboratorio que se encarga de la conservación y almacenamiento de los microorganismos.

El punto medular dentro un cepario es que cada microorganismo representa la mayor inversión que se puede generar y la finalidad de contar con un cepario dentro de una institución de educación pública o cualquier otra , es obtener material biológico con total autonomía, que facilita los procesos de control de calidad, enseñanza e investigación.

Dos de los mayores retos que enfrenta el cepario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza es garantizar la máxima calidad para el proceso de conservación y la correcta administración del material biológico.

El manual para la identificación y conservación microbiana se realizó a través de la búsqueda de información actualizada y la revisión de documentos pasados. Después de la revisión de varios artículos científicos y libros que abarcan las áreas de biotecnología, medicina, infectología, microbiología y crioconservación, se constato que la información para el proceso de la conservación bacteria es amplia y que el área esta totalmente desarrollada, con el fin de cumplir los objetivos por el cual se realizó el presente manual, se basó la información en fuentes bibliográficas internacionales y confiables, tal como el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática y La Federación Mundial para la Colección de Cultivos.

En la realización del manual para la identificación y conservación microbina, se organizó la información e ilustraciones alusivas a cada tema o capítulo, además, se incluyeron temas como la historia de la colección de cultivos, la introducción a las técnicas de conservación y en el capítulo de las Fichas de identificación y conservación bacteriana se trato de justificar su inclusión dentro del cepario de cada una de las bacteria en existencia, se incluyeron temas como la descripción morfológica, su epidemiología y aspectos clínicos, las pruebas bioquímicas para realizar su identificación. Dentro de la búsqueda de información no se encontró un manual parecido al realizado.

El manual abordo el manejo y conservación de cepas ATCC, algo que es sumamente importante para la carrera de Químico Farmacéutico

Biológica, este tema permitirá la comprensión y reforzamiento de los conocimientos proporcionados dentro del salón de clases y a su vez contribuye en la actualización y difusión de la importancia de tener un cepario dentro de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

En el desarrollo del manual se describieron los principales conceptos y parámetros para la técnicas de crioconservación y resiembra continua, se hizo mención los pro y contras de cada uno de los métodos, se analizaron los detalles técnicos a tener en cuenta para mejor cada uno de los métodos, y se explicó con el más fino detalle cada uno de los fundamentos que permite realizar cada uno de los métodos.

El interés por el tema de la conservación bacteriana ha surgido, en los últimos años, la utilidad de cepas de referencia para realizar control microbiológico a nivel farmacéutico o a nivel clínico ha detonado una mayor búsqueda de información sobre el tema.

Aunado a todo esto ,la adquisición de cepas de referencia, a nivel clínico, industrial y de las distintas áreas de investigación, sin importar el campo o área de trabajo representa una fuente inversión adquirir cepas de referencia por lo que se necesitan métodos estandarizados para la conservación de este tipo de cepas, con la finalidad de resguardar cada uno de las características, bioquímicas, fenotípicas y genotípicas de cada una de ellas.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la conservación e identificación microbiana es uno de los temas centrales e importantes que lleva a cabo un Químico y que es un área crítica, donde se necesita mayor conocimiento con la finalidad de no poner en riesgo la pérdida de un cepa microbiana.

De esta manera el trabajo final, consiste en el Manual para la identificación y conservación microbiana del cepario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que cumpliendo con su objetivo, permitirá a cualquier persona interesada en la conservación microbiana relacionar los conceptos claves, para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en el manual para la conservación microbiana, el manual consta de información estructurada e ilustraciones, que favorecerán el aprendizaje y desarrollo práctico de cualquier persona que lo consulte.

La realización del Manual para la identificación y conservación microbiana del cepario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, colabora de forma general, con la actualización y adquisición de conocimientos en el área de conservación microbiana, incluso puede ser un tema complementario al plan de estudios de la carrera Químico Farmacéutico Biológico impartida en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Además, el tema y la información contenida en dicho manual, permite ampliar su utilidad a carreras relacionadas con el área de la salud, como son biología, medicina, infectología entre otras.



REFERENCIAS

1. Real Academia española. Diccionario de la lengua española. 22nd ed. Madrid.
2. American Type Culture Collection. American Type Culture Collection. [Online]. [cited 2017 07. Available from: https://www.atcc.org/Documents/Learning_Center/Resources_for_Microbiology.aspx.
3. Roberto AL. Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de los alimentos. 1st ed. Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez ; 2004.
4. R MP, EJB, JH. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology ; 2013.
5. Koneman EW, CW, SDA, GWP. Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
6. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3rd ed. México: Médica Panamericana ; 2007.
7. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
8. Prats G. Microbiología clínica/Guillem Prats. 1st ed. Buenos Aires : Médica Panamericana; 2005.
9. Forbes B, Sahm DF. Bailey & Scott: diagnóstico microbiológico / Betty Forbes. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
10. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9th ed. Buenos Aires : Médica Panamericana; 2007.
11. Pommerville JC. Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Boston: Jones & Bartlett; 2007.
12. Doern C, Burnham C. MINIREVIEW It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. Journal of Clinical microbiology. 2010 Oct; 48(11): p. 3829-3835.
13. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2nd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
14. Loesche W. Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. Microbiological Reviews. 1986 Dec; 50(4): p. 353-380.
15. Bonifaz T. Micología Médica Básica. 4th ed. México: Mc Graw Hill; 2012.
16. Kurtzman P, Fell W, Boekhout T. The Yeast a Taxonomic Study. 5th ed.: Elsevier; 2011.
17. Pommerville J. Fundamentals of Microbiology. 10th ed. Boston: Jones & Bartlett; 2011.



18 Sumbali G, Mehrotra R. Principles of Microbiology. 1st ed. New Delhi: McGraw-Hill; 2009.

19 Brock. Biología de los Microorganismos. 12th ed.: Pearson Educación; 2009.