

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Aplicación de un micrométodo para la crioconservación de las cepas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

RAMÍREZ GARCÍA ANAYETZY

Director de tesis: Dr. José Luís Alfredo Mora Guevara

Asesor de tesis: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Lugar de desarrollo:

Laboratorio No. 1 Primer Piso de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimental Zaragoza

CD. MX. 2019



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 la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme brindado una educación digna, satisfactoria y poder concluir esta importante etapa de mi vida, siendo mi segunda casa; así como el abrirme las puertas desde los 12 años en Iniciación Universitaria.

Al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara y a la Mtra. Yolanda Flores Cabrera por ser una parte vital en el desarrollo de mi última etapa; por haberme brindado sus conocimientos, tiempo, dedicación y paciencia en el camino para poder terminarla.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura y al Prof. Armando Ramírez González por brindarme su apoyo cuando lo necesité, hacer un ambiente en el laboratorio mas ameno; disfrutar de su amabilidad y sencillez.

A mis sinodales que se tomaron el tiempo para revisar y aprobar mi tesis para un mejor desarrollo.

A mis profesores por haber sido parte fundamental en mi educación en toda la carrera.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis papás Irma y Oscar que han estado conmigo estos 27 años apoyándome incondicionalmente, creyendo en mí cada día, alentándome para ser una mejor persona y sin su ayuda no podría realizarlo. ¡Gracias por todo!. Esto es también para ustedes. Los amo.

A mi hermana Aketzalli que has estado en este proceso a mi lado ayudándome, dándome consejos en los momentos que los he requerido, alentarme para terminarla y sé que sin tu ayuda hubiera sido más complicado. Sabes qué estaré para ti siempre y espero que sea un ejemplo para que logres alcanzarlo también. Te amo.

A Juan por darme el amor y apoyo cuando lo he necesitado, por brindarme consejos en los momentos complicados y llegar a mi vida acompañándome en esta etapa importante para mí. Por eso y mucho más... Te amo!

A mi cuñado Ángel por acompañarnos en estos momentos buenos. Gracias por los consejos.

A mi abuelo Alejandro, que aunque ya no está conmigo sabe que también esto es por y para él, sin su ayuda no podría estar donde estoy. Te quiero y te extraño.

A mis amigos por estar ahí cuando lo necesitaba, poder encontrar una buena amistad en las buenas y en las malas.

CONTENIDO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. | MARCO TEÓRICO..... | 2 |
| 2.1. | INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA..... | 2 |
| 2.2. | BACTERIAS..... | 2 |
| 2.3. | METABOLISMO..... | 3 |
| 2.4. | MEDIOS DE CULTIVO..... | 5 |
| 2.5. | TINCIONES..... | 6 |
| 2.5.1 | TINCIÓN DE GRAM..... | 7 |
| 2.6. | CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS..... | 9 |
| 2.6.1 | CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO..... | 10 |
| 2.6.2 | CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO..... | 11 |
| 2.6.3 | CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO..... | 12 |
| 2.7. | GÉNERO <i>STREPTOCOCCUS</i> | 16 |
| 2.7.1 | CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ESTREPTOCOCOS..... | 18 |
| 2.7.2 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 18 |
| 2.7.3 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 20 |
| 2.8. | GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> | 22 |
| 2.8.1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 22 |
| 2.8.2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 25 |
| 2.9. | ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MCFARLAND..... | 26 |
| 2.10. | FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS..... | 27 |
| 2.10.1 | PRUEBA DE COAGULASA..... | 27 |
| 2.10.2 | COAGULASA LIGADA..... | 28 |
| 2.10.3 | COAGULASA LIBRE..... | 29 |
| 2.10.4 | PRUEBA DE CATALASA Y PEROXIDASA..... | 29 |
| 2.10.5 | CRECIMIENTO EN AGAR SAL Y MANITOL..... | 30 |
| 2.10.6 | PRUEBA (REACCIONES) CAMP..... | 31 |
| 2.10.7 | PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE PIRROLIDONIL- β -NAFTILAMIDA (PYR) | 32 |
| 2.10.8 | CRECIMIENTO EN AGAR SANGRE..... | 32 |
| 3. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 33 |
| 4. | OBJETIVOS..... | 33 |
| 5. | HIPÓTESIS..... | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6. | DISEÑO METODOLÓGICO | 34 |
| 6.1. | TIPO DE ESTUDIO | 34 |
| 6.2. | POBLACIÓN DE ESTUDIO | 34 |
| 6.3. | CRITERIOS | 34 |
| 6.4. | VARIABLES | 35 |
| 6.5. | MATERIAL | 35 |
| 6.6. | DIAGRAMA DE FLUJO | 37 |
| 6.7. | TÉCNICAS | 38 |
| 6.7.1 | IDENTIFICACIÓN INICIAL DE LAS 2 CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2..... | 38 |
| 6.7.2 | REACTIVACIÓN DE LAS 4 CEPAS MICROBIANAS | 39 |
| 6.7.3 | MICROMÉTODO DE CONSERVACIÓN USANDO LECHE SVELTY COMO AGENTE CRIOPROTECTOR | 39 |
| 6.7.4 | PRUEBA DE CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS (-20 °C, 4 °C, TEMPERATURA AMBIENTE)..... | 40 |
| 6.7.5 | TINCIÓN DE GRAM..... | 42 |
| 6.7.6 | PRUEBAS BIOQUÍMICAS | 43 |
| 6.7.7 | PRUEBA ENZIMÁTICA PASTOREX | 45 |
| 7. | RESULTADOS | 47 |
| 8. | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 62 |
| 9. | CONCLUSIONES | 69 |
| 10. | PROPUESTAS | 70 |
| 11. | REFERENCIAS | 71 |

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología. Para la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), en el caso de la alimentación ha sido importante para la fabricación de bebidas alcohólicas (vino, cerveza, licores, etcétera), así como también la producción de queso y yogurt; así como para la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. Existen microorganismos que degradan la materia orgánica haciéndola nuevamente disponible para las plantas, actividad sin la cual el mundo sería un enorme basurero; así como la importancia para poder obtener plásticos sin la necesidad de recurrir al petróleo, todo esto empleando bacterias a nivel industrial con el fin de disminuir el impacto ambiental creciente en los últimos años.

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación, es por esto la necesidad de mantener las propiedades de las cepas microbianas como las mencionadas anteriormente y además sus características bioquímicas, morfología microscópica y macroscópica. En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z.) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, se aplicó un micrométodo de crioconservación para *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes* para garantizar la supervivencia al menos del 70% de las células por un periodo de 6 meses; el propósito de este proyecto es corroborar que el método es confiable, el empleo de controles de calidad para verificar la viabilidad de las cepas, pureza y poder garantizar la preservación de sus características bioquímicas y morfológicas es de vital importancia. En este proyecto se realizaron pruebas para verificar su viabilidad, estabilidad bioquímica de las cepas en estudio

y poder así asegurar la calidad de las bacterias crioconservadas y con los resultados obtenidos se pueda aplicar para la conservación de futuras cepas bacterianas, así como favorecer la reducción de costos, aumentar el tiempo de resiembra.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA

La ciencia de la microbiología tiene una antigüedad de sólo 200 años, aunque el descubrimiento reciente del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en momias egipcias de 3000 años nos recuerda que los microorganismos han estado presentes durante mucho más tiempo. Si bien se sabe relativamente poco acerca de lo que pensaban los antiguos sobre las causas, la transmisión y el tratamiento de enfermedades la historia de los últimos siglos se conoce mejor. La Microbiología, es la encargada del estudio de los organismos microscópicos, deriva de 3 palabras griegas: mikros (pequeño), bios (vida) y logos (tratado) que conjuntamente significan el estudio de la vida microscópica. ⁽¹⁾

Estos microorganismos se encuentran en todos los ecosistemas, en una estrecha asociación con todos los tipos de organismos multicelulares. Miles de millones habitan en un cuerpo humano sano, como simples inquilinos o como integrantes de las funciones corporales. Siendo principalmente considerados como microorganismos a las bacterias, hongos, protozoos, helmintos y virus. Teniendo más interés en aquellos que son perjudiciales para el hombre, llamados patógenos. Las bacterias se clasifican como organismos procariontes, mientras que entre los eucariontes se incluyen los hongos, los protozoos y los helmintos, así como los seres humanos. ⁽¹⁾

2.2. BACTERIAS

Las bacterias son organismos procariontes, unicelulares, esto quiere decir que están formados por una sola célula carente de membrana nuclear. Su ácido

desoxirribonucleico (ADN) se encuentra libre en el citoplasma y no tienen organelos membranosos (mitocondrias, cloroplastos, o aparato de Golgi). Cuentan con una pared celular (capa de polisacáridos) que envuelve la célula proporcionándole rigidez y protección. Además de contar con una pared celular, muchas bacterias forman en su interior estructuras de protección llamadas endoesporas, las cuales contienen el material genético y las sustancias para poder sobrevivir debido a las condiciones ambientales. Algunas son tan resistentes que permiten a la bacteria sobrevivir a altas temperaturas e incluso a largos periodos de tiempo. Se reproducen asexualmente por medio de una forma de división celular denominada fisión binaria, que produce copias genéticamente idénticas a la célula original. En condiciones ideales, algunas bacterias se duplican en cuestión de minutos por lo que podrían en principio, dar origen a una población de millones de bacterias en poco tiempo. ⁽²⁾

Estos a su vez se dividen en dos grupos:

Bacterias típicas: la mayoría de géneros bacterianos que poseen metabolismo definido y presentan características morfológicas como pared celular y material genético.

Bacterias atípicas: Son bacterias que carecen de los componentes estructurales característicos o de las capacidades metabólicas de las bacterias típicas. ⁽²⁾

2.3. METABOLISMO

Se define como el conjunto de procesos por los cuales un microorganismo obtiene la energía y los nutrientes que necesita para vivir y reproducirse. Los procesos sintéticos involucrados en el crecimiento bacteriano incluyen más de 2000 reacciones bioquímicas.

Las principales funciones del metabolismo son:

- Formar las subunidades que luego serán utilizadas en la síntesis de macromoléculas.

- Proporcionar la energía necesaria para todos aquellos procesos que la requieran como transporte activo, movilidad, biosíntesis, etc. ⁽³⁾

El metabolismo se divide en dos clases de reacciones:

- **Catabolismo:** La energía proporcionada a la célula por su fuente de energía es liberada y conservada en forma de ATP; pues suponen la rotura de moléculas orgánicas complejas relativamente grandes, para dar lugar a moléculas pequeñas más sencillas. ⁽⁴⁾
- **Anabolismo:** Es la síntesis de moléculas orgánicas complejas a partir de otras más sencillas. El anabolismo requiere energía, que es transferida desde la fuente de energía a los sistemas sintéticos celulares a través del ATP; a su vez requiere una fuente de electrones los cuales son “almacenados” en forma de poder reductor. El poder reductor es necesario porque el anabolismo es un proceso reductor: se suministran electrones a las moléculas pequeñas a medida que son empleadas en la construcción de macromoléculas. ⁽⁴⁾

Los distintos tipos de metabolismo microbiano pueden clasificarse en tres criterios distintos: ⁽³⁾

- 1) Según como el organismo obtiene el Carbono para la construcción de la masa celular:
 - Autótrofo: a partir de CO₂
 - Heterótrofo: de compuestos orgánicos
- 2) Según como el organismo obtiene los equivalentes reductores para la conservación de energía:
 - Litótrofo: moléculas inorgánicas

- Organótrofo: moléculas orgánicas

3) Según la forma en la que el organismo obtiene la energía para vivir y crecer:

- Quimiótrofo: compuestos químicos externos
- Fotótrofo: luz

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una preparación sólida o líquida empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismos, tales como bacterias, hongos y virus. Para ser efectivo, el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse. Aunque todos los microorganismos necesitan fuente de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, carbohidratos, lípidos, proteínas, factores de crecimiento, indicadores, colorantes y varios materiales, la composición precisa de un medio satisfactorio dependerá de la especie que se desea cultivar, pues las necesidades nutricionales varían enormemente.^(4,5)

Los medios de cultivos son muy variados debido a los diferentes sustratos que contienen permiten el crecimiento e identificación microbiana, estos medios para su clasificación se dividen por su composición en: ⁽⁶⁾

- Básicos: Contienen los nutrientes mínimos necesarios para organismos poco exigentes.
- Enriquecidos: Algunos microorganismos patógenos importantes requieren medios con complementos para crecer. Estos complementos incluyen sangre desfibrinada, suero, líquido de ascitis, huevo y glicerol.
- Selectivos: Medio que contiene sustancias que impiden el desarrollo de cualquier bacteria que no sea la que está bajo investigación.
- Diferenciales: Son medios selectivos a los cuales se les agregaron sustancias o moléculas específicas y además poseen un indicador para saber por el vire si se dio o no la reacción.

Una colonia es un conjunto de microorganismos, macroscópicamente visible, sobre un medio sólido. Debido a que cada colonia deriva de una sola célula, cada colonia representa un cultivo puro. Para obtener cultivos puros los métodos más utilizados son ⁽⁴⁾:

- El aislamiento por estrías simples para muestras con poca cantidad de microorganismos.
- Aislamiento por estría cruzada
- Aislamiento por extensión con varilla

2.5. TINCIONES

Las tinciones son utilizadas ampliamente en microbiología con el fin de identificar ciertas estructuras características de algunos microorganismos, en dichas tinciones se utilizan colorantes para que estos interactúen con las estructuras a teñir mediante sus características ácido-base

Los colorantes se dividen en 3 grupos:

- Básicos: interactúan con estructuras ácidas como núcleos y nucléolos.
- Ácidos: interactúan con estructuras básicas como el citoplasma o citosol.
- Neutros: conformados por un colorante básico y un colorante ácido dando lugar a una sal.

Las tinciones se clasifican en:

- **Simples:** es una solución acuosa o alcohólica de un colorante básico. Aunque los diferentes colorantes se unen de forma específica a las distintas partes de las células, el propósito principal de una tinción simple es destacar el microorganismo completo para que se vean las formas y las estructuras celulares básicas.

- **Diferenciales:** reaccionan de modo diferente con las distintas clases de bacterias y por lo tanto pueden ser empleadas para establecer una distinción entre ellas, las tinciones más utilizadas son la tinción de Gram y la tinción de ácido-alcohol resistente.
- **Especial:** se utilizan para colorear y aislar partes específicas de microorganismos, como endoesporas y flagelos, y para detectar la presencia de cápsula ⁽⁷⁾.

2.5.1 TINCIÓN DE GRAM

El procedimiento de tinción diferencial desarrollada en 1884 por el médico danés Hans Christian Gram, es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología. Es un ejemplo de tinción diferencial. La tinción de Gram divide *Bacteria* en dos clases: Gram negativos y Gram positivos. ⁽⁸⁾

El procedimiento de la tinción de Gram se ilustra en la Figura 1. En el primer paso, el frotis se tiñe con el colorante básico cristal violeta, el colorante primario. A continuación, se trata con una solución yodada que actúa como mordiente. El yodo intensifica la interacción entre la célula y el colorante de manera que la célula se tiñe más intensamente. Posteriormente se decolora el frotis lavándolo con acetona o etanol. Este paso produce el aspecto diferencial de la tinción de Gram; las bacterias grampositivas retienen el cristal violeta, mientras que las bacterias Gram negativas lo pierden y aparecen incoloras. Finalmente, el frotis se tiñe de nuevo (tinción de contraste) con un colorante básico, simple, de un color diferente al del cristal violeta. La safranina, el colorante de contraste más común, tiñe las bacterias Gram negativas de rosa a rojo, dejando a las bacterias Gram positivas de color morado oscuro Figura 2. ^(4,8)

Imagen 1. Pasos en el método de Tinción de Gram. ⁽⁹⁾

Imagen 2. Bacterias Gram positivas (morado) son *Staphylococcus aureus*; las bacterias Gram negativas (rojo

2.6. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Una cepa es un cultivo puro que proviene de un progenitor determinado. En microbiología se aplica el aislamiento de un microorganismo de un medio natural determinado. Para su identificación se pueden emplear técnicas genotípicas y bioquímicas, todo lo anterior no hubiera sido posible sin la existencia de bibliotecas de microorganismos también conocidos como cepario. ⁽¹¹⁾

Mientras que un cepario es una colección de especies de microorganismos que se mantienen en el laboratorio, por diversos métodos de conservación, durante un tiempo determinado. En la industria farmacéutica algunos microorganismos son seleccionados de ceparios y utilizados para la producción de algún metabolito importante, el conocimiento, conservación y uso de la diversidad microbiana contribuyen al desarrollo de la microbiología clínica la cual se encarga del estudio de microorganismos patógenos para el ser humano, por lo que para conformar un cepario es necesario conservarlas por distintas técnicas que ayuden a prevenir algún posible cambio metabólico o genético manteniendo así las características de cada cepa. ^(11,12)

Se llaman cepas puras aquellas en las que se encuentra correctamente identificado su género, especie (en algunos casos subespecie) y se tiene certeza de que no está contaminada de agentes inorgánicos ajenos a la cepa o que no se encuentra invadida por otro tipo de microorganismos. ⁽¹²⁾

Las cepas se pueden agrupar según sus características comunes: ⁽¹²⁾

- **Biovar** o biotipo, son aquellas cepas que tienen características bioquímicas y fisiológicas especiales.
- **Morfovar** o morfotipo, con morfología específica.
- **Serovar** o serotipo, con características antigénicas específicas.
- **Patovar** o patotipo, con propiedades patógenas para ciertos hospedadores.
- **Fagovar** o fagotipo, con especificidad para que sean lisadas por ciertos bacteriófagos.

En la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés) se hallan variadas técnicas disponibles para la conservación de microorganismos, por lo que debe considerarse la guía "*Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*" publicada en 2010 apartado 7 de sus guías generales ⁽¹³⁾, en la que establece que por seguridad y minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos procedimientos diferentes que brinden seguridad y reduzcan los riesgos de pérdida durante el almacenamiento ⁽¹⁴⁾; existen tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son:

- El cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación.
- Durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células.
- Las células permanezcan genéticamente estables ⁽¹⁵⁾.

En general, existen tres categorías en las que se agrupan los métodos de conservación dependiendo del tiempo en que permanecen viables las células conservadas, a corto, mediano y largo plazo ⁽¹⁵⁾.

2.6.1 CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, fundamentalmente por carecer de los equipos necesarios, porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos o porque las cepas contengan construcciones genéticas trayendo consigo que estas pierdan elementos, determinadas características especiales que se utilicen para medir el efecto del medicamento o fármaco en la misma, desde el punto de vista tóxico ⁽¹⁵⁾. La resiembra periódica es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo utilizando tubos inclinados y medio líquido

en refrigeración que abarcan de **15-20 días** de almacenamiento, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo ⁽¹⁶⁾.

2.6.2 CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO

A mediano plazo, es el término que agrupa las técnicas con las que se logra mantener la viabilidad de los cultivos entre **dos y cinco años**. Se destacan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena estéril, sílica gel, perlas de vidrio, esferas de plástico o papel filtro) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible ⁽¹⁷⁻²²⁾ así como el almacenamiento en suelo estéril, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), métodos bien documentados en especial para los hongos. Para este tipo de conservación se utiliza un soporte sólido para atenuar el metabolismo.

Algunas técnicas utilizadas para la conservación a mediano plazo son:

➤ **Tierra fértil estéril**

El microorganismo se añade a el sustrato (sílica gel, arena, etc.), que protegerán al microorganismo de la desecación, se coloca en un recipiente al vacío, esto es perfecto para el microorganismo que esporula (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*) ^(17,18)

➤ **Desecación en papel filtro**

Se utiliza un papel muy absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por procedimiento que se llama desecación líquida (L-DRY) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero tratar de evitar un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células. ^(17,18,19)

➤ **Desecación en bolitas de alginato**

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior es la desecación al aire hasta que pierde un 70% de su contenido de agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas entre 4 °C y 18 °C, pudiéndose guardar incluso a -80 °C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato.

(17,18,19)

2.6.3 CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

En esta categoría se ubican los métodos de congelación (a -70 °C y -196 °C) y la liofilización, como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables **por 10 años o más**, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos (cultivos de hongos, bacterias, levaduras, algas, suero, células sanguíneas, entre otros) y que sean reconocidas como técnicas de elección.^(17,18,19,20,21)

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto, así garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo.^(23,24)

Algunas técnicas de conservación a largo plazo son:

➤ **Mantenimiento de cultivos por congelación**

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este tipo de conservación es utilizada en la

práctica común, para trabajo continuo, ya que mantiene un ritmo elevado de metabolismo. No se recomienda utilizar este tipo de conservación ya que provoca mucho estrés al microorganismo y la reactivación es muy rápida. ^(18,19,24)

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

- 1. Edad de las células:** En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. ⁽¹⁵⁾
- 2. Velocidad en la congelación y descongelación:** Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37 °C. ⁽¹⁵⁾
- 3. Temperatura de almacenamiento:** La facilidad con que se puede obtener nitrógeno líquido (temperatura de -196 °C) ha permitido otro medio para mantener cultivos. En este procedimiento las células se congelan con un agente crioprotector no iónico (glicerol o dimetil sulfóxido), se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica. Los microorganismos congelados en tubos cerrados o sellados, se guardan en refrigeradores con nitrógeno líquido; los cultivos se pueden mantener satisfactoriamente mediante liofilización, como también se mantienen de igual manera con nitrógeno líquido. Además se ha comprobado que con el procedimiento de congelación por nitrógeno líquido (temperatura de -196 °C o bien, en fase gaseosa con una temperatura de -140 °C) se mantienen muchos microorganismos que no se conservan por liofilización. ⁽¹²⁾

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y descongelen varias veces.

(15)

- 4. Empleo de agentes crioprotectores:** Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. (15)

➤ **Conservación por liofilización**

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada.

En las células conservadas por este método no hay crecimiento puesto que la actividad de agua es cero igual que en la congelación pero a diferencia de la primera, los liofilos no tienen agua en el medio debido a la sublimación. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Sin embargo es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liofilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18 °C- 20 °C.

El medio de preservación es esencial para proteger las células de los daños de los productos de congelación y sobresecado. La elección del medio

depende del microorganismo de manera que se logre mantener la viabilidad y permitir un buen recobrado posterior al proceso de liofilización.

No se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante la liofilización, que es un proceso suave. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células.

Para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias; la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o chopped meat (sin carne) para bacterias anaerobias, etc.

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, la concentración de los microorganismos, entre otros. ⁽²²⁾

Los factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son: ⁽¹⁹⁾

- 1. Tipo de microorganismo:** Hay algunos microbios que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior.
- 2. Concentración celular:** Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras, debido a que siempre se pierde alrededor de 10^2 unidades formadoras de colonia (UFC) durante el proceso.
- 3. Temperatura durante la sublimación:** Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50 °C.

4. **Grado de deshidratación alcanzado:** Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
5. **Atmósfera del tubo:** Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
6. **Condiciones de almacenamiento:** La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18 °C y sin bajar de los 0 °C. Los liófilos se deben guardar en la oscuridad.

Es conveniente para la producción y distribución masiva de cultivos, la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos se mantengan en largos períodos de tiempo, no se requiere de una atención constante después de almacenarse los cultivos liofilizados y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio. Otro método dentro de la liofilización es utilizando capilares de vidrio mediante el cual se reduce el espacio de almacenamiento y el costo de la distribución de los cultivos. Sin embargo, es complejo y caro, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío, por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados. ^(19,22)

2.7. GÉNERO *STREPTOCOCCUS*

Los miembros del género de *Streptococcus* son cocos Gram positivos, catalasa negativos que tienden a crecer desarrollando cadenas en los medios líquidos, como producto final del metabolismo de los carbohidratos forman grandes cantidades de ácido láctico; son anaerobios facultativos. Son miembros de la Biota normal del ser humano y además agentes etiológicos de varias enfermedades graves que incluyen neumonía neumocócica, meningitis, sepsis, endocarditis bacteriana y faringitis exudativa estreptocócica, infecciones de heridas y abscesos viscerales.

Los cocos son bacterias que tienen forma esférica, es una de sus tres formas celulares, las otras son bacilos (forma de barra o vara) y espirilos (forma espiral).

Proviene del neolatín coccus, que a su vez proviene del griego kokkos (κόκκος) que significa "baya". ^(25,26)

Clasificación:

Como todas las bacterias, son organismos vivos. En algunas especies las células aparecen agrupadas siguiendo diferentes patrones, que son clasificados según su forma.

Los cocos son células regularmente esféricas; pueden presentarse como células individuales o asociados en agrupaciones características que acostumbran a ser útiles para su identificación. Se forman diplococos cuando los cocos se dividen y permanecen juntos en parejas. Cuando las células quedan adheridas tras divisiones repetidas en un único plano, se forman largas cadenas de cocos; este patrón se observa en los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*.

Staphylococcus se divide en planos al azar formando agrupaciones irregulares parecidas a racimos de uvas. (Figura 3). ^(4,27)

Imagen 3. Tipos de cocos. ⁽²⁸⁾

2.7.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos se tiñen fácilmente con colorantes ordinarios y por lo general son más pequeños y ovoides que los estafilococos. Suelen estar agrupados en cadenas en las que las células ovoides se unen por sus extremos, ya que se dividen en un plano y tienden a conservarse unidas. La longitud de estas formaciones puede variar desde un solo par hasta cadenas continuas de cerca de 30 células, según la especie y las condiciones de crecimiento. Los estreptococos de importancia médica no son acidorresistentes, no forman esporas y no tienen motilidad. Algunos miembros de este grupo forman cápsulas compuestas por complejos polisacáridos o ácido hialurónico. ⁽²⁹⁾

Los estreptococos crecen mejor en medios enriquecidos bajo condiciones aerobias o anaerobias (son facultativos). Se prefiere el agar-sangre porque satisface las necesidades de crecimiento y sirve como indicador de los patrones de hemólisis. Las colonias formadas son pequeñas y su tamaño varía entre el de un punto de alfiler y 2 mm de diámetro. Pueden estar rodeadas por una zona en la que se han hemolizado los eritrocitos suspendidos en el agar. Cuando esta zona es clara, el estado se *hemólisis beta*. Cuando el resultado es un medio turbio (hemólisis incompleta), con tonalidad verdosa en el agar, se denomina *hemólisis alfa*. Los estreptococos son metabólicamente activos y atacan a diversos carbohidratos, proteínas y aminoácidos. En ellos, la fermentación de la glucosa produce sobre todo ácido láctico. A diferencia de los estafilococos, los estreptococos son negativos a la catalasa. ^(4,8,30)

2.7.2 *Streptococcus pyogenes*

Las cepas de *S. pyogenes* son cocos esféricos de diámetro comprendido entre 1 y 2 μm que forman cadenas cortas en las muestras clínicas y cadenas de mayor longitud cuando crecen en medios de cultivo. Su crecimiento es óptimo en el medio de agar sangre enriquecido, pero se inhibe cuando contienen una concentración elevada de glucosa. Después de 24 horas de incubación se observan colonias blancas de 1 a 2 mm con grandes zonas de β -hemólisis.

El marco estructural básico de la pared celular es la capa de peptidoglucano, la cual tiene una composición parecida a la de otras bacterias grampositivas. En el interior de la pared celular se encuentran los antígenos específicos de grupo y de tipo. El carbohidrato específico de grupo, el cual constituye aproximadamente el 10% del peso seco de la célula (antígeno del grupo A de Lancefield; compuesta de N-acetilglucosamina y de ramosa). Este antígeno se usa para clasificar a los estreptococos. La proteína M es la principal proteína específica de tipo que se asocia a los estreptococos virulentos. Se compone de dos cadenas polipeptídicas que forman una hélice alfa. La proteína se ancla a la membrana citoplasmática, se extiende a través de la pared celular y sobresale por encima de la superficie celular.

Otros componentes importantes de la pared celular de *S. pyogenes* son las proteínas tipo M, el ácido lipoteicoico y la proteína F. El ácido lipoteicoico y la proteína F facilitan la unión a las células del organismo anfitrión, al formar un complejo con la fibronectina que se encuentra presente en la superficie de las células del organismo anfitrión. Algunas cepas de *S. pyogenes* forman una cápsula externa de ácido hialurónico, no se diferencia a nivel antigénico del ácido hialurónico presente en los tejidos conjuntivos de mamífero. Las cepas de *S. pyogenes* encapsuladas son las responsables más probables de las infecciones sistémicas graves.

Estos procesos se deben a que la bacteria produce numerosas toxinas y exoenzimas involucradas en la Invasividad como son las estreptolisinas O (hemolisina lábil al oxígeno capaz de lisar los eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células en cultivo) y S (hemolisina estable en presencia de oxígeno, no inmunogénica y ligada a la célula que puede lisar eritrocitos, leucocitos y plaquetas), las estreptocinasas (enzimas que intervienen en la degradación del plasminógeno, con la consiguiente liberación de la proteína plasmina, que a su vez encarga la degradación de la fibrina y el fibrinógeno con la lisis de los coágulos y depósitos de fibrina), y la DNasa entre otras.

En general, la enfermedad por *S. pyogenes* se debe a cepas de adquisición reciente que causan infección de la faringe o la piel. La faringitis (figura 4)

producida por el microorganismos antes mencionado representa una enfermedad que afecta a niños de 5 y 15 años, aunque los lactantes y los adultos también son vulnerables a esta entidad. El patógeno se transmite de una persona a otra a través de gotitas respiratorias. Las infecciones de tejidos blandos por ejemplo pioderma, erisipela, celulitis, fascitis se ven precedidas generalmente de una colonización inicial de la piel por estreptococos del grupo A, después de la cual los microorganismos se introducen en los tejidos superficiales o profundos a través de una alteración de la barrera que constituye la piel. ^(1,8,29,32,33)

Imagen 4. Faringitis causada por el microorganismo *Streptococcus pyogenes*.

2.7.3 *Streptococcus agalactiae*

Las cepas de *S. agalactiae* se pueden subdividir en función de la presencia de 3 marcadores serológicos: ⁽¹⁾

- 1) El antígeno B o el antígeno polisacárido de la pared celular específico de grupo (antígeno de agrupamiento de Lancefield; compuesto de ramosa, N-acetilglucosamina y galactosa).
- 2) Nueve polisacáridos de la cápsula específicos de tipo (Ia, Ib y II a VIII). Los polisacáridos específicos de tipo son importantes marcadores epidemiológicos, siendo los serotipos Ia, III y V los que se asocian con mayor frecuencia a la colonización y la aparición de enfermedad.
- 3) Proteína de superficie conocida como antígeno C.

Se halla formando parte de la flora del tubo digestivo y puede colonizar la vagina. Por transmisión perinatal causa infecciones graves en el recién nacido, incluyendo bacteriemia, neumonía, meningitis y sepsis posparto en la madre. Es recomendable controlar la presencia de este estreptococo en la vagina de las mujeres en la última etapa del embarazo, para adoptar medidas profilácticas ante el parto dirigidas a erradicar el microorganismo con objeto de evitar la infección de la madre y del recién nacido.

El control para descartar el estado de portadora de la embarazada se puede hacer mediante el cultivo de una muestra vaginal en el medio de Granada, que es un medio diferencial en el que se forman colonias de color calabaza intenso muy característico. (Figura 5). ^(1,8,29,33)

Imagen 5. Colonias de *Streptococcus agalactiae* característicamente pigmentadas de color

En comparación con las mujeres embarazadas que sufren una infección por estreptococos del grupo B, los hombres y las mujeres no gestantes afectados por infecciones por estreptococos del grupo B presentan generalmente una edad mayor y padecen otras entidades debilitadoras predisponentes. Las formas de presentación más frecuentes son la bacteriemia, neumonía, infecciones óseas y articulares, infecciones cutáneas y de tejidos blandos. ⁽¹⁾

El diagnóstico de la infección neonatal se hace por cultivo de la sangre, del líquido cefalorraquídeo o de muestras de otros territorios afectados. Tras el aislamiento por cultivo, *S. agalactiae* puede identificarse por su carácter betahemolítico y por pruebas bioquímicas, confirmándose mediante la detección del antígeno B por aglutinación. ⁽²⁹⁾

2.8. GÉNERO STAPHYLOCOCCUS

El género *Staphylococcus* se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que tienden a formar racimos (su denominación se deriva de la palabra griega *staphyle*, que quiere decir racimo de uvas); sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los estafilococos tienen un diámetro entre 0,5 y 1 μm y son anaerobios facultativos (crecen aerobia y anaerobiamente) inmóviles capaces de crecer en un medio con elevada concentración de sal (p. ej., cloruro sódico al 10%) y a temperaturas de 18-40 °C. Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. En la actualidad, el género comprende de 40 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. Algunas especies se encuentran habitualmente. Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. ^(1,8,24,29,33)

2.8.1 *Staphylococcus aureus*

Las células de *S. aureus* son uniformemente grampositivas, de tamaño regular y se apiñan entre sí en racimos. La pared celular del microorganismo está constituida por un peptidoglucano Gram positivo típico intercalado con moléculas de un ácido ribitol-teicoico, que es antigénico y relativamente específico para *S. aureus*. En la mayor parte de las cepas, el peptidoglucano está cubierto por proteínas de superficie; una de ellas, la proteína A que se une a la capa de peptidoglucano o a la

membrana citoplásmica y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas (Ig). Además, la detección de la proteína A puede utilizarse en pruebas de identificación específicas.

El estudio más utilizado para distinguir a *S. aureus* de otros estafilococos es la producción de coagulasa, que se fija de manera no enzimática a la protombina y forma con ella un complejo que inicia la polimerización de la fibrina (al incubar en cuestión de horas produce un coágulo de fibrina). La emulsión densa en agua también se aglutina de inmediato al mezclarse con plasma debido a la fijación directa del fibrinógeno; esta prueba es rápida denominada como prueba de aglutinación de laminilla, que tiene una correlación elevada con la coagulasa (95%). Otra forma de aislarlo es en agar sal-manitol complementado con cloruro sódico al 7,5% (el cual inhibe el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, y de manitol (fermentado por *S. aureus*). (Figura 6)

Imagen 6. Colonias de *Staphylococcus aureus* en

S. aureus produce toxinas y enzimas extracelulares con actividad biológica como toxina alfa, exfoliatina, superantígenos de toxina pirógena, enterotoxinas estafilocócicas y toxina del síndrome de choque tóxico.

S. aureus causa enfermedad mediante la producción de toxina o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina:

- **Síndrome de la piel escaldada:** Descamación diseminada del epitelio en lactantes; ampollas carentes de microorganismos o leucocitos.

- **Intoxicación alimentaria:** Después de haber ingerido alimentos contaminados con la toxina termoestable, inicio rápido de vómitos intensos, diarrea y cólicos; resolución en el plazo de 24 horas.

- **Shock tóxico:** intoxicación multisistémica caracterizada en un primer momento por la presencia de fiebre, hipotensión y un exantema maculoeritematoso; elevada mortalidad en ausencia de tratamiento antibiótico inmediato y eliminación del foco de la infección.

Así como también infecciones cutáneas:

- **Impétigo:** Infección cutánea localizada que se caracteriza por la presencia de vesículas rellenas de pus sobre una base eritematosa.

- **Foliculitis:** Impétigo que afecta a los folículos pilosos

- **Forúnculos:** Grandes nódulos cutáneos rellenos de pus y dolorosos

- **Carbuncos:** Unión de forúnculos con extensión hacia los tejidos subcutáneos e indicios de enfermedad sistémica (fiebre, escalofríos, bacteremia)

- **Bacteriemia y endocarditis:** Diseminación de bacterias hacia la sangre desde un foco de infección; la endocarditis se caracteriza por daños al revestimiento endotelial del corazón.

- **Neumonía y empiema:** Consolidación y formación de abscesos en los pulmones; se observa en sujetos muy jóvenes, ancianos y en pacientes con enfermedad pulmonar de base o reciente; se ha reconocido una forma grave de neumonía necrosante con shock séptico y mortalidad alta.

- **Osteomielitis:** Destrucción de huesos, en especial del área metafisaria de los huesos largos ^(1,8,11,29,36)

2.8.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una de 33 especies conocidas pertenecientes al género *Staphylococcus*. Es parte de la flora comensal de la piel y en consecuencia se considera parte de la flora humana. Aunque el *S. epidermidis* no suele ser patógeno, los pacientes con sistemas inmunes comprometidos son a menudo blanco de desarrollar una infección.

Estas infecciones pueden ser tanto nosocomiales o adquiridas en la comunidad, pero que representan una amenaza mayor para los pacientes del hospital. Este fenómeno puede ser el resultado de un uso continuo de antibióticos y desinfectantes en los hospitales, lo que lleva a la presión evolutiva hacia cepas más virulentas y resistentes del organismo.⁽²⁴⁾ *S. epidermidis* es también una preocupación importante para las personas con catéteres u otros implantes quirúrgicos, ya que se sabe que causa las biopelículas que crecen en estos dispositivos de plástico y es un importante factor de virulencia de *S. epidermidis*. Una causa probable es que se une a las proteínas de superficie sangre y proteínas de matriz extracelular.

Como se mencionó anteriormente, *S. epidermidis* causa biopelículas que crecen en los dispositivos de plástico que se colocan dentro del cuerpo esto ocurre más comúnmente en los catéteres intravenosos y prótesis médicas. La infección también puede ocurrir en pacientes sometidos a diálisis o a cualquier persona con un dispositivo plástico implantado que puede haber sido contaminado. Otra enfermedad que causa es la endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas.⁽⁴⁾

Es un microorganismo muy resistente, que consiste en cocos Gram positivos no móviles que crece en colonias de aproximadamente 1.2 milímetros de diámetro y no hemolíticas en agar sangre.

Se clasifica como catalasa positiva, coagulasa negativa, anaerobia facultativa que puede crecer mediante la respiración aeróbica o por fermentación de hidratos de carbono como la glucosa, sacarosa, en presencia de lactosa también produce gas, forma productos ácidos finales, es positiva para la producción de ureasa y es

sensible a la novobiocina proporcionando una prueba importante para distinguirlo de *Staphylococcus saprophyticus*, que es resistente a la novobiocina. ⁽³⁴⁾

La cápsula del organismo, conocida como polisacárido de adhesión intercelular (PIA), se compone de polisacárido sulfatado. Esto permite que otras se unan a la biopelícula ya existente, creando una biopelícula multicapa. Tales biopelículas disminuyen la actividad metabólica de las bacterias dentro de ellas. Esta disminución del metabolismo, en combinación con el deterioro de la difusión de los antibióticos, hace que sea difícil para los antibióticos para combatir con eficacia este tipo de infección.

2.9. ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MCFARLAND

La escala nefelometría de turbidez McFarland es usada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo, esta multiplicación en medios líquidos se manifiesta por un aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz o la opacidad en el centro. Cuando mayor sea el número de bacterias, mayor será la opacidad del medio.

La finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y por espectrofotometría se crea una recta patrón, de forma que se pueda detectar la concentración de las diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria y la formación de agregados).

Se trata de una serie numerada de 10 tubos. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico con diferentes cantidades de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%, para obtener diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos.⁽³⁵⁾ En la Tabla 1 se muestra la equivalencia de UFC/mL en BaCl₂ y H₂SO₄ al 1%.

| Escala de McFarland | | | |
|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| TUBO | BaCl₂ 1% | H₂SO₄ 1% | U.F.C/mL |
| 1 | 0.1 | 9.9 | 3.0 x10 ⁸ |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 6.0 x10 ⁸ |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 9.0 x10 ⁸ |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 1.2 x10 ⁹ |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 1.5 x10 ⁹ |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 1.8 x10 ⁹ |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 2.1 x10 ⁹ |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 2.4 x10 ⁹ |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 2.7 x10 ⁹ |
| 10 | 1.0 | 9.0 | 3.0 x10 ⁹ |

Tabla 1. Equivalencia de UFC/mL para cada tubo de McFarland y las proporciones de H₂SO₄ y BaCl₂ que se utilizan para preparar cada tubo de la escala.

2.10. FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

2.10.1 PRUEBA DE COAGULASA

Principio: Probar la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa (estafilocagulasa).

Bioquímica: La estafilocagulasa (coagulasa), la enzima producida por *Staphylococcus aureus*, es relativamente estable al calor y resiste temperaturas de hasta 60 °C durante 30 minutos. Esta proteína es excretada al medio extracelular por las cepas humanas de *S.aureus* y se inactiva con facilidad por las enzimas proteolíticas (proteasas).

Esta enzima actúa sobre algunos constituyentes del género para producir un coagulo o trombo In vitro, la coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma lo que produce la formación de un coagulo de fibrina. ⁽³⁵⁾

Plasma Coagulasa bacteriana Coagulo de fibrina

2.10.2 COAGULASA LIGADA

La coagulasa ligada se detecta por el procedimiento en portaobjeto, la prueba de agregación del plasma. NO está presente en los filtrados de cultivo sino que se encuentran en la superficie de las paredes celulares. La coagulasa ligada, o factor de agregación (CF), es responsable de la absorción de fibrinógeno y lo altera de modo tal que precipita sobre los estafilococos y causa a agregación de estos, lo que produce la aglutinación rápida de las células. El factor de agregación se convierte el fibrinógeno en fibrina de manera directa, sin la participación de los factores del plasma, y no es inhibido por los anticuerpos contra la coagulasa libre.

Interpretación: Se considera positivo cuando marca agregación o granulación dentro de los 5-20 seg y negativo si la muestra no presenta cambios; la suspensión permanece homogénea. ⁽³⁵⁾

Imagen 7. Prueba de coagulasa ligada para microorganismo *Staphylococcus aureus*

2.10.3 COAGULASA LIBRE

La prueba de coagulasa en tubo detecta ambas coagulasas, la libre y la ligada, siendo la única distinción entre ambas la antigénica. La coagulasa libre extracelular reacciona con una sustancia en el plasma (factor del suero) que Dubos y Hirsch y Drummond y Tager denominaron factor de reacción de la coagulasa o CFR, una sustancia termoestable similar a la trombina.

Interpretación: Se considera positivo con la formación de coágulo o filamentos de fibrina separados y negativo cuando hay ausencia de formación del coágulo, la suspensión permanece homogénea (igual que el tubo inoculado).⁽³⁵⁾

Imagen 8. Prueba de coagulasa libre y ligada para el microorganismo *Staphylococcus aureus*

2.10.4 PRUEBA DE CATALASA Y PEROXIDASA

Principio: Probar la presencia de las enzimas catalasa o peroxidasa o de ambas.

Bioquímica: Cuando las flavoproteínas reducidas o las proteínas con azufre y hierro reducidas se unen con el oxígeno y las oxidasas presentes en la cadena respiratoria de todas las bacterias, se forman dos compuestos tóxicos; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical Superóxido O_2 .

El H_2O_2 es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona de manera directa con el oxígeno gaseoso por vía de la reducción de los electrones para formar H_2O_2 , no por la acción directa entre el hidrógeno y el oxígeno molecular.

La catalasa y la Superóxido dismutasa están presentes en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (aerotolerantes) que contienen citocromos; las excepciones principales son las especies de *Streptococcus*, que carecen de catalasa. Los anaerobios obligados (estrictos) carecen de ambas enzimas; la mayoría de las bacterias anaerobias (por ejemplo *Clostridium*) poseen peroxidasa en lugar de catalasa.

Interpretación: Se considera positiva la prueba cuando la muestra presenta burbujeo inmediato, observado con facilidad; formación de O₂ y negativa cuando la muestra presenta ausencia de burbujas.⁽³⁵⁾

Imagen 9. Prueba de catalasa ⁽²³⁾

2.10.5 CRECIMIENTO EN AGAR SAL Y MANITOL

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de diversas muestras.

El agar sal y manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. La fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de estafilococos. Los estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol. ⁽³⁷⁾

2.10.6 PRUEBA (REACCIONES) CAMP

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para producir y elaborar el factor CAMP, que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina estafilocócica (β -lisina) sobre eritrocitos ovinos (oveja) o bovinos (buey) para producir un fenómeno lítico en la unión de los dos microorganismos.

Bioquímica: La prueba (reacción) CAMP se basa en el hecho de que los estreptococos del grupo B producen un factor (factor CAMP) que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* en un medio de agar con sangre ovina o bovina. El sinergismo es una acción coordinada o correlacionada por dos o más microorganismos; el sinergista, factor CAMP, es un adyuvante de la acción de otro microorganismo.

Interpretación: Se considera una reacción CAMP positiva en la muestra cuando hay una producción de una característica zona en punta de flecha (llama) de hemólisis completa (clara) y negativa cuando hay ausencia del fenómeno en punta de flecha cuando se incuba en la jarra con vela o en condiciones aerobias. ⁽³⁵⁾

Imagen 10. Prueba de CAMP ⁽³⁵⁾

2.10.7 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE PIRROLIDONIL- β -NAFTILAMIDA (PYR)

Principio: Detectar la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa (PYR).

Prueba presuntiva específica tanto para los estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*S. pyogenes*) como para la mayor parte de las especies de *Enterococcus* del grupo D; diferencia los estreptococos del grupo A de otras especies de *Streptococcus*. Prueba altamente sensible; reemplaza la bacitracina y la tolerancia a la sal (crecimiento en NaCl al 6,5%). ⁽³⁵⁾

2.10.8 CRECIMIENTO EN AGAR SANGRE

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos. Al ser suplementados con sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. El agregado de 5-10% sangre ovina desfibrinada estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis. ⁽³⁸⁾

Imagen 11. Sangre Agar Base con hemólisis alfa, beta y gamma.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología. Por eso es necesario conservar los microorganismos, esto se garantiza mediante las colecciones de cultivos. La necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad impuso la introducción de métodos de conservación de microorganismos que reducen al mínimo la posibilidad de contaminación que garantizan al menos la supervivencia del 70-80% de las células por un periodo determinado de tiempo.

En el laboratorio 1 de microbiología e inmunología de la UMIEZ de la FES Zaragoza actualmente no se cuenta con un método de conservación a mediano plazo para los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *S.agalactiae* que sea sencillo, eficiente, barato y que su conservación sea superior a 1 mes, por lo que el propósito de este proyecto será aplicar un micrométodo en capilares, determinando su viabilidad y estabilidad bioquímica donde se espera que su tiempo de conservación sea al menos de 6 meses.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar el micrométodo de crioconservación desarrollado en el Laboratorio 1 de Microbiología e Inmunología de la U.M.I.E.Z de la F.E.S. Zaragoza.

Objetivos específicos

- Realizar las técnicas de control de calidad para los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *S. agalactiae*.
- Adaptar el micrométodo de crioconservación del Laboratorio 1 de Microbiología e Inmunología de la U.M.I.E.Z. de la F.E.S Zaragoza para las

cepas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*.

- Determinar la viabilidad de los 4 microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *S. agalactiae* a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses en 3 temperaturas diferentes.

5. HIPÓTESIS

Si se utiliza el micrométodo en capilar para conservar a los microorganismos mencionados, entonces la viabilidad de los microorganismos después de 6 meses será al menos de un 70% a tres temperaturas diferentes -24 °C, 4 °C y Temperatura ambiente.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudio experimental y prolectivo

6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas bacterianas de la familia:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*

6.3. CRITERIOS

Criterios de Inclusión: Cepas puras y baja patogenicidad, correctamente identificadas.

Criterios de exclusión: Cepas contaminadas, Cepas de alto riesgo y patogenicidad.

6.4. VARIABLES

Variable dependiente: Cepas bacterianas del género *Streptococcus* y *Staphylococcus*

Variable independiente: Temperatura de almacenamiento, líquido crioprotector y tiempo de conservación.

6.5. MATERIAL

- Mechero Fisher
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensaye de 13x100 con tapón de rosca
- Tubos de ensaye de 16x150 con tapón de rosca
- Gradilla
- Cajas Petri. KIMAX
- Lápiz Punta Diamante
- Algodón
- Gasa
- Papel Kraft
- Tubos Capilares Microhematocrito Sencillos s/ heparina. CORNING
- Pinzas de Disección
- Jeringa estéril 10 mL
- Micropipeta de 5-50 μ L. BioHit Proline
- Micropipeta de 10-100 μ L. BioHit Proline
- Micropipeta de 100-1000 μ L. BioHit Proline
- Pipeta Powerpette. JENCONS
- Puntas para micropipeta. BioClean
- Criotubos estériles con radiación. Gamma Eppendorff
- Marcador indeleble. Sharpie
- Matraz Erlenmeyer 500 mL. PYREX
- Matraz bola 25 mL. PYREX
- Celdas estériles para espectrofotómetro. Milton Roy

- Probeta de 100 mL. KIMAX
- Cinta Adhesiva Maskin Tape
- Vaso de precipitados de 250 mL. PYREX
- Portaobjetos. LAUKA

EQUIPO

- Autoclave. Presto
- Olla de presión. PRESTO
- Incubadora 37 °C ± 2 °C. SHEL LAB
- Microscopio. PRIMO STAR ZEISS
- Balanza Digital. Explorer PRO
- Congelador -24 °C. Tor Rey
- Espectrofotómetro. THERMO SCIENTIFIC SPECTRONIC 20+
- Refrigerador 4 °C. MABE TWIST AIR

MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo nutritivo DIBICO
- Agar Soya Trypticaseína BDBioxon
- Agar S110 con Sal y Manitol DIBICO
- Agar Base de Sangre MCDLab

REACTIVOS

- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Solución Salina Isotónica estéril 0.9% PISA
- Colorantes de Gram (Cristal Violeta y Safranina) SIGMA
- Lugol SIGMA
- Solución Alcohol-Yodo
- Hipoclorito de sodio GREAT VALUE
- Leche descremada SVELTY
- Alcohol etílico al 70%
- Peróxido de Hidrógeno

CEPAS A UTILIZAR

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus agalactiae**
- *Streptococcus pyogenes* *

*Nota: Las cepas antes mencionadas fueron obtenidas a partir de fluidos biológicos e identificados en el equipo automatizado VITEK2 en la clínica #47 del IMSS con ayuda del Q.F.B. Armando Ramírez González.

6.6. DIAGRAMA DE FLUJO

6.7. TÉCNICAS

6.7.1 IDENTIFICACIÓN INICIAL DE LAS 2 CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2

Las cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* fueron identificadas por medio del Sistema automatizado VITEK 2, el cual es muy preciso y confiable; estas cepas fueron aisladas mediante fluidos biológicos en el laboratorio de Microbiología de la Clínica No. 47 “Vicente Guerrero” del Instituto Mexicano del Seguro Social con ayuda del Q.F.B Armando Ramírez González.

Imagen 12. Equipo automatizado de identificación Bacteriana VITEK 2 utilizado para la identificación de las cepas *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*.

6.7.2 REACTIVACIÓN DE LAS 4 CEPAS MICROBIANAS

1. Realizar una siembra mediante un asa bacteriológica estéril de las 4 cepas en Caldo Nutritivo, Incubar a 37 °C por 24 h.
2. Pasadas las 24 h de incubación realizar la técnica de tinción de Gram para posteriormente observarlas al microscopio.
3. Realizar resiembra a partir de los Caldos Nutritivos previamente incubados con las 4 cepas, en tubo inclinado de Agar Soya-Trypticaseína por estría cruzada.

6.7.3 MICROMÉTODO DE CONSERVACIÓN USANDO LECHE SVELTY COMO AGENTE CRIOPROTECTOR

I. Ajuste de la carga de Microorganismos mediante el Nefelómetro de McFarland. Para cada bacteria:

1. Medir 3 mL de Solución salina isotónica estéril (0.9% Laboratorio PISA) con una jeringa estéril y pasarlos al tubo inclinado de Agar Soya-Trypticaseína inoculado el microorganismo a conservar y agitar hasta obtener una suspensión turbia.
2. Pasar esta suspensión a una celda estéril para espectrofotómetro y comparar visualmente con el tubo 8 de Mc Farland (2.4×10^9 UFC), en caso de estar más turbia la suspensión resultante, agregar solución salina isotónica estéril (0.9% Laboratorio PISA) suficiente para obtener una turbidez igual al tubo 8 del nefelómetro. Posteriormente, realizar un segundo ajuste en el espectrofotómetro entre 3 y 7 de transmitancia; y una vez ajustada la solución pasarla a un tubo de ensaye 13 x 100 con tapón de rosca estéril. Marcar con tinta indeleble cada tubo capilar en tres partes iguales.

II. Ajuste de la concentración y esterilización de leche descremada Svelty mediante calor húmedo a presión

1. Pesar 3 g de leche descremada Svelty en polvo respectivamente en un matraz Erlenmeyer y diluir en 10 mL de Agua destilada.
2. Tapar el matraz Erlenmeyer con un tapón de algodón y gasa, esterilizar por calor húmedo a 121 °C 15 lb de presión por 10 minutos en la olla de presión.

III. Prueba como crioprotector de la leche descremada de concentración elegida

1. Tomar una muestra de 2.5 mL de la solución ajustada del paso I con una micropipeta y depositarla en un matraz bola estéril con tapón que contengan 7.5 mL de leche descremada estéril, tapar, agitar y rotular.
2. En una zona aséptica llenar una tercera parte 200 tubos capilares estériles cerca del mechero con la suspensión del paso anterior, permitir que la suspensión quede en el centro del capilar y sellar a la flama el tubo capilar por ambos extremos. Este procedimiento se realizara para cada una de las cuatro cepas bacterianas.
3. Colocar los 200 tubos en tubos Eppendorff de 50 mL con tapa de rosca para conservarlos en congelación a -24 °C.

6.7.4 PRUEBA DE CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS (-20 °C, 4 °C, TEMPERATURA AMBIENTE)

1. Conservar los tubos capilares de cada bacteria a tres diferentes temperaturas (- 20 °C, 4 °C y Temperatura ambiente), como se especifica en la siguiente tabla:

| BACTERIA | CRIOPROTECTOR | TEMPERATURA DE CONSERVACION | CANTIDAD DE TUBOS CAPILARES |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Leche descremada | Temperatura ambiente | 10 |
| | | 4 °C | |
| | | -24 °C | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | Temperatura ambiente | |
| | | 4 °C | |
| | | -24 °C | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | | Temperatura ambiente | |
| | | 4 °C | |
| | | -24 °C | |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | | Temperatura ambiente | |
| | | 4 °C | |
| | | -24 °C | |

Tabla 2. Conservación de las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes* a tres diferentes temperaturas.

IV. Prueba de viabilidad al tiempo 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses

1. Limpiar los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada con solución de 2% de yodo en alcohol al 70%.
2. Marcar los extremos del tubo capilar con un lápiz punta diamante y romper por los extremos del tubo con unas pinzas, vaciar su contenido en 15 mL de Caldo Nutritivo, tapar, agitar e incubar a 37 °C por 24 h.

3. Posterior a las 24 h de incubación tomar un inóculo de 100 μ L del Caldo Nutritivo del paso anterior y con una pipeta Powerpette JENCONS inocular en una caja Petri estéril.
4. Agregar enseguida 15 mL de Agar Soya-Trypticaseina estéril a 45 °C en la misma caja Petri y homogenizar. Dejar solidificar e incubar a 37 °C por 24 h.
5. A cada uno de los cultivos, determinar morfología colonial y microscópica a las 24 h de incubación.

Nota: Realizar este procedimiento para cada periodo de conservación (1, 2, 3, 4,5 y 6 meses) y para cada una de las bacterias en estudio. Realizar pruebas de control de calidad al inicio y al final del período de conservación.

6.7.5 TINCIÓN DE GRAM

1. Tomar una pequeña porción del inóculo a determinar con un asa de platino previamente esterilizada y extenderla en un portaobjetos.
2. Secar la preparación hasta que el inóculo se seque por completo y fijar a la flama.
3. Agregar unas gotas de cristal violeta, dejar por 1 minuto y enjuagar con agua corriente.
4. Agregar unas gotas de Lugol, dejar por 1 minuto y enjuagar con agua corriente.
5. Agregar unas gotas de solución Alcohol-Acetona hasta eliminar el excedente de colorante y lavar la laminilla con abundante agua.
6. Agregar safranina por 30 segundos y lavar la laminilla con agua corriente.
7. Registrar la morfología microscópica indicando forma, agrupación y Gram.

6.7.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA CATALASA

❖ Método en portaobjeto

1. Con una aguja de inoculación, recoger el centro de una colonia pura de un cultivo de 18 a 24 h y colocar sobre un portaobjeto de vidrio limpio.
2. Colocar una gota de H₂O₂ al 30% en los microorganismos colocados en el portaobjeto con un gotero o pipeta Pasteur.
 - (a) No invertir el orden del procedimiento ya que pueden ocurrir resultados falsos positivos.
 - (b) No mezclar con la aguja de inoculación o el asa. No es necesario mezclar el H₂O₂ y el cultivo.

Interpretación: Detectar la formación de burbujas. Se considera como prueba positiva. ⁽³⁵⁾

PRUEBA COAGULASA

❖ Prueba en portaobjeto (prueba rápida para detección de coagulasa ligada).

1. Colocar una gota de solución fisiológica (NaCl al 0,85%) sobre un portaobjeto transparente y limpio.
2. Emulsionar con suavidad una suspensión densa de microorganismos *Staphylococcus* (provenientes de una asada de una única colonia pura aislada en un medio sólido).
3. Con suavidad, mezclar una pequeña asada de plasma humano fresco probado con anterioridad en la suspensión de estafilococos; la mezcla debe ser homogénea.
4. Colocar un microorganismo control positivo y uno control negativo en el mismo portaobjeto para ser probado de manera simultánea.

Interpretación: Se considera la prueba positiva cuando ocurre dentro de los 5-20 seg una aglutinación blanca. ⁽³⁵⁾

❖ Prueba en tubo. Detección de coagulasa **ligada y libre**.

1. En un tubo de vidrio estéril, agregar 0.5 mL de plasma humano, sin diluir y una gran asada de una colonia pura de una placa de agar.
2. Rotar el tubo suavemente para lograr la suspensión de las bacterias. **No sacudir.**
3. Incubación: baño de agua a 37 °C, 4 h; observar cada 30 minutos para la coagulación.
 - a. Cuando se controla, no sacudir ni agitar el tubo. Inclinar suavemente el tubo para ver si hay un coágulo.

Interpretación:

Se considera positiva cuando:

- Formación de coágulo o filamentos de fibrina separados.
 - a. Completo: coágulo en todo el tubo.
 - b. Parcial: el coágulo no se extiende a todo lo largo de la columna líquida. ⁽³⁵⁾

CRECIMIENTO EN AGAR SAL Y MANITOL

1. Suspender 111 gramos del polvo en 1 litro de agua destilada.
2. Reposar 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo.
4. Esterilizar 15 minutos a 121 °C.
5. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Interpretación:

- Microorganismos fermentadores del manitol: Colonias amarillas
- Microorganismos no fermentadores del manitol: Colonias del color de medio, rojas. ^(37, 39)

CRECIMIENTO EN AGAR SANGRE

1. Suspender 40 g del medio en 1 litro de agua purificada.
2. Calentar con agitación suave hasta completa disolución del polvo y hervir durante 1 minuto.

3. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
4. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y añadir sangre de carnero estéril y defibrinada al 5%.
5. Homogeneizar y vaciar en placas de Petri estériles.

Interpretación: Para el medio de cultivo contenido sangre, observar las reacciones de hemólisis:

Hemólisis alfa: Lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

Hemólisis beta: Lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.

Hemólisis gamma: Ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio. ⁽³⁸⁾

6.7.7 PRUEBA ENZIMÁTICA PASTOREX

La prueba se aplica a las colonias de estreptococos B-hemolíticos aislados en agar sangre o agar Columbia.

Preparación de los extractos:

1. Poner 0,3 mL de solución de enzima de extracción en un tubo de hemolisis para cada cepa aislada.
2. Tomar 5 a 10 colonias de una cultura fresca de estreptococos y disociarlas en la enzima, hasta obtener una turbidez visible a simple vista.

Identificación del grupo de los extractos:

1. Homogeneizar completamente el reactivo de látex por agitación.
2. Depositar 1 gota de cada látex en los círculos de la tarjeta de aglutinación. (Mantener el frasco en posición vertical).
3. Con una pipeta, poner una gota de extracto en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación.
4. Homogeneizar el contenido de cada círculo con un bastoncillo. Utilizar un bastoncillo distinto para cada círculo.
5. Agitar la tarjeta con un movimiento orbital, durante un minuto como máximo.

Interpretación:

- ✓ Reacción positiva: aparición de aglutinados rojos sobre fondo verde.
- ✓ Reacción negativa: suspensión homogénea parda
- ✓ Reacciones específicas:
 - Débiles aglutinados sobre fondo pardo
 - Aglutinaciones múltiples.

Imagen 13. Prueba enzimática. PASTOREX.

| Pruebas control de calidad | <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Grupo Lancefield | B | A |
| CAMP | + | - |
| Hidrólisis del hipurato | + | - |
| Voges-Proskauer | + | - |

Tabla 3. Principales pruebas bioquímicas para diferenciar las cepas *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*.

| Pruebas control de calidad | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Sal y Manitol | Fermenta manitol | No fermenta manitol |
| Coagulasa libre | + | - |
| Coagulasa ligada | + | - |
| Catalasa | V ⁺ | + |

Tabla 4. Principales pruebas bioquímicas para diferenciar las cepas *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*.

7. RESULTADOS

En el Laboratorio 1 de la UMIEZ se realizó la conservación de 200 capilares para cada una de las cepas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes* con un inóculo de 45 µL para así almacenarlos y realizar su viabilidad mensual durante 6 meses; así como verificar las pruebas bioquímicas al inicio y al final con el propósito de corroborar que no se presentó ningún cambio bioquímico enzimático durante ese período de tiempo.

En las imágenes 14, 15, 16 y 17 se muestran los 200 capilares de cada una de las cepas ya mencionadas anteriormente en capilares con el crioprotector (Svelty) utilizando tubos Eppendorff con tapón de rosca.

Imagen 14, 15, 16 y 17. Tubos capilares guardados en tubos Eppendorff de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*.

En las imágenes 18, 19, 20 y 21 se muestran capilares de cada una de las cepas en estudio, los cuales posteriormente para su reactivación se necesitaba abrirlos por los extremos utilizando lápiz diamante y en condiciones de esterilidad, para poder ser inoculados en Caldo Nutritivo e incubarlos a 37 °C por 24 h.

Imagen 18, 19, 20 y 21. Tubos capilares donde se resguardan las bacterias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*. inoculados con el agente crioprotector (Leche Svelty).

En la imagen 22, 23, 24 y 25 se muestran los tubos con la inoculación por estría cruzada en Agar Soya-Trypticaseína de cada una de las cepas en estudio, previamente obtenidas de caldo nutritivo e incubadas 24 h a 37 °C.

Imagen 22, 23, 24 y 25. Tubos en pico de flauta de Agar Soya-Trypticaseína con inoculación de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *S. agalactiae*.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Obteniéndose los tubos en pico de flauta con cada una de las cepas se realizaron frotis con una tinción de Gram para comprobar la existencia de cocos Gram positivos presentes en cada una de las cepas en estudio con la ayuda de un microscopio (Objetivo 100x) como se observan en las imágenes 26, 27, 28 y 29.

Imagen 26. Identificación de *Staphylococcus epidermidis* tinción de Gram cocos Gram positivos, objetivo 100x.

Imagen 27. Identificación de *Staphylococcus aureus* tinción de Gram cocos Gram positivos, objetivo 100x.

Imagen 28. Identificación de *Streptococcus agalactiae* tinción de Gram cocos Gram positivos,

Imagen 29. Identificación de *Streptococcus pyogenes* tinción de Gram cocos Gram positivos,

Las cepas en estudio se realizaron sus controles de calidad para verificar la confiabilidad del micrométodo de conservación, haciendo un ensayo macroscópico observando su morfología colonial con diferentes medios selectivos de cultivo y realizando sus principales pruebas bioquímicas al inicio (tiempo 0) y al final (sexto mes). Finalmente, para evaluar la viabilidad de las cepas se utilizó el método de vaciado en placa mensualmente por un período de 6 meses; se determinaron 3

diferentes temperaturas (-24 °C, 4 °C y Temperatura ambiente) y se observó su comportamiento por ese lapso de tiempo.

VIABILIDAD DE LAS CEPAS POR VACIADO EN PLACA

En la tabla 5 se registraron los resultados obtenidos por el período de 6 meses en las tres diferentes temperaturas establecidas (-24 °C, 4 °C y temperatura ambiente) para las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

| TIEMPO (MES) | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | |
|-----------------|------------------------------|------------|----------------------|-----------------------------------|------------|----------------------|
| | -24 °C | 4 °C | Temperatura ambiente | -24 °C | 4 °C | Temperatura ambiente |
| 1 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 2 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 3 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 4 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 5 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 6 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |

Tabla 5. Resultados de las pruebas de viabilidad en los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

En la tabla 6 se registraron así como los anteriores, los resultados obtenidos por el período de 6 meses en las tres diferentes temperaturas establecidas (-24 °C, 4 °C y temperatura ambiente) para las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*.

| TIEMPO (MES) | <i>Streptococcus agalactiae</i> | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | | |
|-----------------|---------------------------------|------------|----------------------|-------------------------------|------------|----------------------|
| | -24 °C | 4 °C | Temperatura ambiente | -24 °C | 4 °C | Temperatura ambiente |
| 1 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 2 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 3 | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable | Incontable |
| 4 | Incontable | Moderado | Moderado | Incontable | Incontable | Incontable |
| 5 | Incontable | Moderado | Moderado | Incontable | Incontable | Incontable |
| 6 | Incontable | Moderado | Moderado | Incontable | Incontable | Incontable |

Tabla 6. Resultados de las pruebas de viabilidad en los microorganismos *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*.

En las imágenes 30, 31, 32 y 33 se aprecia la viabilidad de las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus epidermidis* al primer y sexto mes con fines demostrativos para confirmar lo obtenido en los resultados en las tablas 5 y 6; sin embargo por ese motivo no se expusieron todas las imágenes de cada una de las cepas.

Imagen 30. Viabilidad de *Streptococcus agalactiae* al primer mes (Incontable)

Imagen 31. Viabilidad de *Streptococcus agalactiae* al sexto mes (Moderado)

Imagen 32. Viabilidad de *Staphylococcus epidermidis* al primer mes (Incontable)

Imagen 33. Viabilidad de *Staphylococcus epidermidis* al sexto mes (Incontable)

MORFOLOGIA COLONIAL. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA.

Los cuadros 1, 2, 3 y 4 muestran las cepas en estudio inoculadas por la técnica de sembrado por agotamiento en Agar Sal y Manitol para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; así como Agar Sangre para *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* para la lectura de morfología colonial.

| Característica | Agar Sal y Manitol |
|-----------------------|---------------------------|
| Color | Color amarillo a blanco |
| Tamaño | 1 a 3 mm |
| Forma | Circular |
| Borde | Redondo |
| Elevación | Convexa |
| Superficie | Lisa |
| Luz reflejada | Brillante |
| Luz transmitida | Traslúcida |
| Consistencia | Cremosa |
| Otras | Fermenta en manitol |

Cuadro 1. Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* en agar Sal y manitol.

| Característica | Agar Sal y Manitol |
|-----------------------|---------------------------|
| Color | Color crema |
| Tamaño | 1 a 3 mm |
| Forma | Puntiforme |
| Borde | Redondo |
| Elevación | Convexa |
| Superficie | Lisa |
| Luz reflejada | Brillante |
| Luz transmitida | Traslúcida |
| Consistencia | Cremosa |
| Otras | No fermenta en manitol |

Cuadro 2. Morfología colonial de *Staphylococcus epidermidis* en agar Sal y manitol.

| Característica | Agar Sangre |
|-----------------------|-----------------------------|
| Color | Verde- grisáceas |
| Tamaño | 1 a 2 mm |
| Forma | Puntiforme |
| Borde | Redondo |
| Elevación | Convexa |
| Superficie | Lisa |
| Luz reflejada | Opaca |
| Luz transmitida | Traslúcida |
| Consistencia | Cremosa |
| Otras | Presenta β -hemólisis |

Cuadro 3. Morfología colonial de *Streptococcus agalactiae* en agar Sangre.

| Característica | Agar Sangre |
|-----------------------|--------------------|
| Color | Verde-grisáceas |
| Tamaño | 1 a 2 mm |
| Forma | Puntiforme |
| Borde | Redondo |
| Elevación | Convexa |

| | | |
|-----------------|-----------------------------|--|
| Superficie | Lisa | |
| Luz reflejada | Opaca | |
| Luz transmitida | Traslúcida | |
| Consistencia | Cremosa | |
| Otras | Presenta β -hemólisis | |

Cuadro 4. Morfología colonial de *Streptococcus pyogenes* en agar Sangre

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A continuación se muestran las pruebas de control de calidad realizadas para las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en las siguientes tablas:

| Prueba bioquímica | MES 0 | | MES 6 | |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 1 | Tubo 2 |
| Coagulasa Libre | + | + | + | + |
| Coagulasa ligada | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + |
| Sal y Manitol | Fermenta en manitol | Fermenta en manitol | Fermenta en manitol | Fermenta en manitol |

Tabla 7. Pruebas bioquímicas realizadas para *Staphylococcus aureus*.

| | MES 0 | | MES 6 | |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Prueba bioquímica | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 1 | Tubo 2 |
| Coagulasa | <u>Libre</u> - | <u>Libre</u> - | <u>Libre</u> - | <u>Libre</u> - |
| | <u>Ligada</u> - | <u>Ligada</u> - | <u>Ligada</u> - | <u>Ligada</u> - |
| Catalasa | + | + | + | + |
| Sal y Manitol | No fermenta en manitol | No fermenta en manitol | No fermenta en manitol | No fermenta en manitol |

Tabla 8. Pruebas bioquímicas realizadas para *Staphylococcus epidermidis*.

En las imágenes 34-41 se aprecia las pruebas de control de calidad que se realizaron a *Staphylococcus aureus* al primer y sexto mes con fines demostrativos para confirmar lo obtenido en los resultados en la tabla 7; sin embargo por ese motivo no se expusieron todas las imágenes del mismo modo para *Staphylococcus epidermidis*.

| | |
|--------------|--------------|
| MES 0 | MES 6 |
|--------------|--------------|

| | |
|--------------|--------------|
| MES 0 | MES 6 |
|--------------|--------------|

Imagen 34 y 35. Prueba de coagulasa ligada para *Staphylococcus aureus* al tiempo 0 y 6 meses.

Imagen 36 y 37. Prueba de catalasa para *Staphylococcus aureus* al tiempo 0 y 6 meses.

| | |
|--------------|--------------|
| MES 0 | MES 6 |
|--------------|--------------|

| | |
|--------------|--------------|
| MES 0 | MES 6 |
|--------------|--------------|

Imagen 38 y 39. Prueba de coagulasa libre para *Staphylococcus aureus* al tiempo 0 y 6 meses.

Imagen 40 y 41. Prueba de coagulasa libre para *Staphylococcus aureus* al tiempo 0 y 6 meses.

Las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* se identificaron por el sistema automatizado VITEK 2, para fines ilustrativos en las imágenes 42 y 43 se demuestra el resultado de las cepas en estudio.

Imagen 42. Identificación y pruebas bioquímicas realizadas por el equipo automatizado VITEK 2 para *Streptococcus agalactiae*.

Imagen 43. Identificación y pruebas bioquímicas realizadas por el equipo automatizado VITEK 2 para *Streptococcus pyogenes*.

En las siguientes imágenes se muestra la identificación del grupo de Lancefield para las cepas *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes* por la prueba de PASTOREX:

Imagen 44. Prueba PASTOREX para identificación del grupo Lancefield de *Streptococcus agalactiae*

Imagen 45. Prueba PASTOREX para identificación del grupo Lancefield de *Streptococcus pyogenes*.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado se analizan los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas a las cepas en estudio durante 6 meses de conservación a tres diferentes temperaturas.

CEPAS:

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus agalactiae

Streptococcus pyogenes

Las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* se obtuvieron por medio del equipo automatizado VITEK 2, fueron aisladas a partir de fluidos biológicos en el laboratorio de Microbiología de la Clínica No. 47 “Vicente Guerrero” del Instituto Mexicano del Seguro Social con la ayuda del Q.F.B. Armando Ramírez González. Al obtenerlas se incubaron en Caldo Nutritivo a 37 °C de 24 a 48 h, se aislaron en medio de cultivo agar Sangre de carnero para su posterior identificación.

Con respecto a las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se tomaron del cepario del Laboratorio1 de Microbiología e Inmunología de la UMIEZ, donde fueron caracterizadas.

ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS

Para la conservación de cada una de las cepas bacterianas se realizaron 200 capilares llenando una tercera parte de su capacidad siguiendo el método de conservación en capilar como se muestran en las imágenes 18-21; estos capilares se guardaron en tubos Eppendorff de 50 mL (imagen 14-17).

Se reactivó 1 capilar de cada bacteria en caldo nutritivo y se incubó a 37 °C de 24 a 48 h, hasta observar la presencia de turbidez. A partir de los tubos anteriores se sembraron por estría simple en tubo inclinado de Agar Soya- Trypticaseina como se muestra en las imágenes 22-25.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

A partir de los tubos de cultivo de agar Soya- Trypticaseína se tomó una muestra de cada una de las 4 cepas en estudio, se realizaron frotos, se fijaron y se tiñeron por la técnica de Gram observándose al microscopio a un objetivo 100x.

Staphylococcus epidermidis presentó una morfología cocos en pares y racimos, Gram Positivos (imagen 26), *Staphylococcus aureus* cocos en pares y racimos, Gram positivo (imagen 27), *Streptococcus agalactiae* cocos en pares y en cadena corta, Gram positivo (imagen 28) y *Streptococcus pyogenes* cocos en pares y en cadena corta, Gram positivo (imagen 29), la literatura nos indica que para cocos en forma de racimos son principalmente para *Staphylococcus* y en forma de pares y cadenas para *Streptococcus*, por lo que si cumple con la morfología establecida.

Los microorganismos Gram positivos presentan una coloración morada debido a que el cristal violeta penetra todas las células bacterianas a través de su pared bacteriana. El lugol que es un compuesto formado por yodo en equilibrio con KI (yoduro de potasio) y I₂ (siulterio), los cuales están presentes para solubilizar el yodo y actúan de mordente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El yodo entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo yodo/ cristal violeta y los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos si.

Para las bacterias en estudio se determinó que no hubo variación en la morfología microscópica que presentaban inicialmente antes de conservarlas respecto a la morfología que presentan después de seis meses de conservación, es por esto que con fines ilustrativos sólo se muestran fotos una sola vez.

VIABILIDAD DE LAS CEPAS POR VACIADO EN PLACA

En esta prueba se evaluó la viabilidad de cada una de las cepas con la técnica de vaciado en placa durante 6 meses de conservación a tres diferentes temperaturas en Caldo Nutritivo. En la Tablas 5 se muestran los resultados para las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se demostró que en las tres diferentes temperaturas establecidas (-24 °C, 4 °C y Temperatura ambiente) se obtuvo mes con mes el recuento era incontables por lo tanto fue satisfactorio; sin embargo para el caso de las temperaturas de 4 °C y Temperatura ambiente al abrir los tubos capilares costó más trabajo debido a que cristalizaban y no podía vaciarse solamente el contenido, ya que se había secado y no se podía realizar su reactivación, para este caso se tuvo que dejar el tubo capilar abierto, dentro del tubo con caldo nutritivo donde se incubó.

En la Tabla 6 para *Streptococcus agalactiae* se puede apreciar que hasta el tercer mes se encuentra con carga microbiana en cantidad abundante para las tres diferentes temperaturas establecidas (-24 °C, 4 °C y Temperatura ambiente), sin embargo a partir del cuarto mes para las temperaturas: 4 °C y Temperatura ambiente se pudo observar que su viabilidad disminuyó en comparación con los primeros meses aproximadamente un 75%. Para *Streptococcus pyogenes* el método fue eficiente en todo el período de conservación, sin embargo para las temperaturas 4 °C y temperatura ambiente el contenido de las cepas en los tubos capilares se cristalizó y esto dificultó el vaciado del tubo capilar para realizar su reactivación del cultivo conservado, por este motivo se tuvo que dejar el tubo capilar abierto dentro del caldo nutritivo donde se incubó.

Los resultados analizados muestran que el Micrométodo de crioconservación fue favorable para las bacterias en estudio en la Temperatura de -24 °C por 6 meses ya que hubo una muy buena viabilidad, los capilares no sufrieron complicaciones ya que se descongelaban a temperatura ambiente y volvían a su estado líquido facilitando su vaciado. Para el caso de las otras dos temperaturas 4 °C y Temperatura ambiente, el contenido de los tubos capilares cristalizaba y esto

dificulta la reactivación de éstos, por lo que no es recomendable almacenarlos a estas temperaturas, por periodos mayores a tres meses

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

Para verificar que las cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* se utilizaron medios de cultivo selectivos para poder apreciar las características morfológicas específicas de cada una de las cepas. En este apartado se evaluaron las características morfológicas colonias en los medios de cultivo empleados o utilizados para cada una de las cepas en estudio, evaluando las siguientes características: color, tamaño, forma, borde, elevación, superficie, luz reflejada, luz transmitida, consistencia.

En agar Sal y Manitol, *Staphylococcus aureus* presentó colonias de 1 a 3 mm de diámetro, color amarillas a blancas, forma puntiforme, borde redondo, elevación convexa de consistencia cremosa, luz reflejada brillante así como luz transmitida translúcida, otra característica importante es que fermenta manitol por lo que el medio da un viraje de color rojo a amarillo (Cuadro 1), esto se debe a que la bacteria crece en el medio con alta concentración de sal y fermenta el manitol, produciendo ácidos, que modifican el pH del medio y vira el indicador rojo de fenol de color rojo a amarillo como indica la bibliografía.

Staphylococcus epidermidis en agar Sal y Manitol presenta colonias color crema, con un tamaño de 1 a 3 mm de diámetro, borde redondo, forma puntiforme, elevación convexa de consistencia cremosa, con luz reflejada brillante así como translúcida para luz transmitida y no fermenta manitol (Cuadro 2), estas características son acorde a las indicadas en la literatura.

Streptococcus agalactiae en Agar sangre presenta colonias color verde-grisáceas, tamaño de 1 a 2 mm de diámetro, puntiformes, borde redondo, elevación convexa con una consistencia cremosa, luz reflejada opaca así como translúcida para la luz transmitida, según la literatura una característica importante para su identificación es la presencia β -hemólisis como un factor de patogenicidad y virulencia, esta

característica se observó un halo claro alrededor de las colonias por la lisis total de los glóbulos rojos como se puede observar en el Cuadro 3.

En agar sangre *Streptococcus pyogenes* presentó colonias puntiformes, color verde-grisáceas, tamaño de 1 a 2 mm de diámetro, borde redondo, consistencia cremosa, elevación convexa, luz reflejada opaca así como translúcida para luz transmitida, al igual que *Streptococcus agalactiae* presenta β -hemólisis se puede apreciar por tener halo claro y brillante alrededor de las colonias como resultado de lisis total de los glóbulos rojos (Cuadro 4), teniendo en cuenta que los resultados que reporta Beckton Dickinson, la empresa fabricante del medio y utilizado para este proyecto reporta que al agregar 5-10% de sangre ovina desfibrinada estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimiento nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis (en este caso β -hemólisis), característica que se observó claramente en Ambas bacterias.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas se realizaron a las cepas en estudio al inicio y al final de aplicación del micrométodo (0 y 6 meses) para poder observar si en ese periodo de tiempo no se modificaron sus características fisiológicas evaluadas con pruebas bioquímicas.

❖ COAGULASA

La prueba de coagulasa se divide en 2 partes: la primera es la prueba de coagulasa en tubo, en esta se detecta ambas coagulasas: la libre y ligada dando como resultado positivo para *Staphylococcus aureus* (tabla 7), ya que formó un coágulo y filamentos de fibrina, esto es porque la enzima que actúa sobre algunos constituyentes del suero para producir un coágulo o trombo, la literatura nos indica que se debe a que la coagulasa libre reacciona con una sustancia en el plasma (factor del suero) denominado factor de reacción de la coagulasa o CFR (sustancia termoestable similar a la trombina), la coagulasa reacciona con el CFR para formar un complejo coagulasa-CFR donde este complejo actúa de manera indirecta para convertir el fibrinógeno en fibrina (imagen 38 y 39), mientras que para

Staphylococcus epidermidis dio un resultado negativo para coagulasa en tubo (libre y ligada) , al no observarse formación de coágulo (tabla 8), ya que *Staphylococcus aureus* a diferencia de *S. epidermidis* y otras especies del mismo género sólo es capaz de formar coágulo de acuerdo en lo descrito en el manual de pruebas bioquímicas McFaddin lo que confirma que se mantuvieron las características bioquímicas de las cepas con el método de conservación implementado.

Para el caso de coagulasa ligada se realiza en portaobjeto dando como resultado positivo para *Staphylococcus aureus*, se realiza mediante esa manera debido a la coagulasa directa o factor de agregación (CF), es responsable del fibrinógeno y lo altera de modo tal que precipita sobre los estafilococos y causa agregación de éstos, lo que se produce la aglutinación rápida de las células (imagen 34 y 35), es por esto que se determinó el resultado para *Staphylococcus aureus* como nos indica el manual de pruebas bioquímicas McFaddin debido a su aglutinación, mientras que para *Staphylococcus epidermidis* el resultado fue negativo (tabla 8); lo que nos demuestra la literatura que también se mantuvieron sus características de las cepas con el método de conservación.

❖ CATALASA

La prueba de catalasa es positiva si después de adicionar peróxido de hidrógeno a una colonia se observa formación de burbujas según la literatura por la separación de la molécula de peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y una de oxígeno como se indica en la siguiente reacción:



Respecto a los resultados de la prueba de catalasa para *Staphylococcus aureus* fue positiva y negativa para *Staphylococcus epidermidis* (tablas 7 y 8). Determinados a partir de cultivos de agar sal y manitol

❖ AGAR SAL Y MANITOL

Para determinar la fermentación de manitol se utilizó el medio sal y manitol; los resultados muestran fermentación positiva de manitol para *Staphylococcus aureus* y negativa para *Staphylococcus epidermidis* (tabla 7 y 8. La fermentación del Manitol se pone en evidencia gracias a la presencia del indicador rojo de fenol, de forma que los *Staphylococcus* coagulasas positivos fermentadores del Manitol como *Staphylococcus aureus* ya que son colonias amarillas y el medio viró a amarillo (imagen 40 y 41), mientras que los *Staphylococcus* coagulasa negativo no fermentadores del manitol como *Staphylococcus epidermidis* crecen como colonias rojas sin alterar el color del medio circundante a las mismas.

Las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* se identificaron por el sistema automatizado VITEK 2 que funciona con una tarjeta de identificación para Gram positivos más significativos, se basa en métodos bioquímicos establecidos y sustratos recientemente desarrollados; existen 43 tests bioquímicos que miden la utilización de fuente de carbono, actividades enzimáticas y la resistencia. Los resultados se obtienen aproximadamente en 8 horas o menos. Esta prueba se determinó al inicio y al final del desarrollo de crioconservación (0 y 6 meses) que obtuvo como resultado una probabilidad mayor al 95%, un nivel de confianza excelente que nos garantiza que las bacterias en estudio son las correctas; al final del informe nos especifica las pruebas bioquímicas que el sistema automatizado evalúa y así mismo dando el resultado de cada una, las pruebas que diferenciaron de *Streptococcus pyogenes* con *Streptococcus agalactiae* fueron: Ala-Fe-Pro Arilamidasa (APPA), L-Prolina- Arilamidasa (ProA), L-PirrolidoniL-Arilamidasa (PyrA) y Tirosina Arilamidasa (TyrA).

Este método se consideró ya que es más eficiente, disminuye el error de falsos positivos, se evita el gasto de reactivos e incluso tiempo y genera mayor grado de confiabilidad.

No obstante con la identificación por medio del equipo automatizado VITEK 2, también se determinó su grupo de Lancefield mediante el kit "PASTOREX" que es una prueba de aglutinación rápida que permite la determinación del grupo de los

estreptococos según la clasificación de Lancefield. Consta de suspensiones de látex que permiten identificar los grupos A, B, C, D, F y G, el kit utiliza un método simple de extracción enzimática. El antígeno presente del extracto obtenido se identifica con partículas de látex recubiertas de los anticuerpos específicos del grupo a evaluar. Estas partículas se aglutinan con fuerza en presencia del antígeno homólogo mientras que se mantienen en suspensión homogénea en ausencia de éste. En las imágenes 44 y 45 se muestran los resultados obtenidos para las cepas *Streptococcus agalactiae* que corresponde al grupo B, mientras que para *Streptococcus pyogenes* corresponde al grupo A, las colonias se aislaron por agar Sangre, ya que esta prueba solo se puede realizar a partir de Agar Sangre o Agar Columbia. La literatura indica que los *Streptococcus* pueden ser clasificados en grupos A, B, C, D, F y G de Lancefield por reacciones serológicas utilizando el Kit PASTOREX. Al realizar la prueba los resultados coincidieron con la literatura y experimental.

9. CONCLUSIONES

Para el objetivo general del presente proyecto se logró aplicar el micrométodo desarrollado en el Primer Piso, Laboratorio 1 de Microbiología e Inmunología de la U.M.I.E.Z. en F.E.S. Zaragoza a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*.

Se realizaron las técnicas de control de calidad para los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* adaptando el micrométodo de crioconservación en la U.M.I.E.Z de las F.E.S. Zaragoza verificando que el método de conservación bacteriana logró mantener la morfología colonial, microscópica y estabilidad bioquímica de las bacterias en un periodo de 6 meses.

Se determinó que los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* lograron

mantener la viabilidad durante los 6 meses de prueba al ser almacenadas a una temperatura de -24 °C.

Finalmente los resultados indican que se logró aplicar un método de conservación sencillo, confiable, de fácil almacenamiento, de bajo costo, sin la utilización de resiembras periódicas, con el alcance de mantener su viabilidad y estabilidad bioquímica de las bacterias por un lapso de tiempo de mínimo 6 meses.

10. PROPUESTAS

- Se propone realizar la viabilidad de las cepas al menos hasta un año.
- Realizar este método para diferentes cepas y tener mayor variedad.
- Realizar mensualmente reactivación de los capilares, tinción de Gram y aislamiento por estría cruzada en medios diferenciales y selectivos.
- Se propone hacer la viabilidad de las cepas mediante el método de diluciones.

11. REFERENCIAS

1. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 6ª edición. España: Elsevier; 2009.
2. Biodiversidad mexicana. Bacterias [internet]. No date [consulta 2018 Agosto 20]. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/Bacterias/bacteria.html.
3. Metabolismo bacteriano [internet]. c2016 [actualizado 2014 Oct 14; [Consulta 2018 Agosto 20]. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>
4. Willey JM, Sherwood ML, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª Ed. España: Editorial Mc Graw Hill; 2009
5. Walker ST. Microbiología. 1ª Ed. México: Editorial McGraw Hill; 2000.
6. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor DL, Spare PD, Inwood MJ. Métodos de Laboratorio. 2ª Ed. México: Nueva Editorial interamericana; 1972.
7. Collins CH, Lyne PM. Métodos microbiológicos. 5ª ed. España: Editorial Acribia; 1989.
8. Kenneth J, Sherris RG. Microbiología Médica. 4ª ed. México: Mc Graw Hill; 2005.
9. <https://www.monografias.com/docs113/tinciones-microbiologia/tinciones-microbiologia.shtml>
10. https://es.wikipedia.org/wiki/Tinción_de_Gram
11. Wolfgang KJ, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Microbiología. 20ª ed. Argentina: Editorial Médica panamericana; 1995.
12. Pelczar MJ, Chan ECS. Microbiología. 4ª ed. México: Mc Graw Hill; 1994.
13. World Federation for Culture Collections. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" [en línea] [Actualización 2016; Consulta 19 de noviembre de 2017]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.

14. Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. World Federation of Culture Collection Standard Committee. UK: Simwoth Press. 1999:24.
15. Arencibia DF, Rosario LA, Gámez R. Métodos generales de conservación de microorganismos. *LITORAD Ediciones*, 2008; 1-14.
16. Hans GS. Microbiología general. 9ª ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2005.
17. García MD, Uruburu F. Colección española de cultivos. La conservación de cepas microbianas. Bogotá Colombia: Universitat de València; 2000.
18. Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000.
19. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Revista Argentina de Microbiología*. 1998; 30:42-51.
20. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. ADN Recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Barcelona: Editorial Labor; 1986.
21. Rehm HJ, Reed G. Biotechnology microbial fundamentals. Vol.1. Alemania: Editorial Verlag Chemie; 1981.
22. Snell JJS, Kirsop BE, Doyle A. General introduction to maintenance methods. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 2001.
23. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007
24. Koneman EW., Allen SD, Janda WM, Schrenberger PC y Win WC. Diagnóstico microbiológico. 5ª Edición. Buenos Aires: Panamericana; 1997.
25. Stuart AT. Microbiología. 1ª Edición. México: Mc Graw-hill interamericana: 2000.
26. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. 12ª Ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2009.L
27. Harvey AR., Champe PC y Fisher BD. Microbiología. 2ª Edición. Barcelona:Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
28. <https://bacteriasyvirus.wordpress.com/clasificacion-de-las-bacterias/>

29. Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas. Madrid: Médica Panamericana; 2012.
30. Forbes BA, Sahm DF y Weissfeld AS. Diagnóstico Microbiológico. 12ª Edición. España: Médica Panamericana 2009.
31. <https://otorrinaringologocertificado.blogspot.com/2015/06/me-duele-la-garganta-puede-ser-infeccion.html>
32. Romero CR. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
33. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25 Edición. México: Mc Graw Hill Lange; 2011.
34. Facultad de Bioquímica y ciencias Biológicas. Guía para la conservación de microorganismos. Cátedra microbiológica General UNI.
35. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2004.
36. Cervantes García Estrella, García González Rafael, Salazar Schettino Paz María. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* 2014; 61(1): 28-40.
37. Becton Dickinson. *Ficha técnica de agar Sal y Manitol*. <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771> (ultimo acceso 01 Septiembre 2018).
38. Britanialab. Ficha técnica de Sangre Agar Base. http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2975a1ab740.pdf (ultimo acceso 20 Agosto 2018)
39. Brizuela-Lab Manual de instrucción. <http://www.brizuela-lab.com.ar/manuales/Manitol%20sal%20agar.pdf> (Ultimo acceso 20 Agosto 2018)
40. Prieto J y Gomez-Lus ML. Género *Staphylococcus*. Microbiología Médica. Garcia-Rodriguez, Picazo. 1ª Ed. España: Doyma; 2000.
41. Burguet-Lago N., Sierra-Prado N., Brito-Godoy L. Conservación de cepas microbianas por el método para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2012; 43. Disponible en:

- <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-3-2012-151-154.pdf> (Último acceso 24 Agosto 2018).
42. Olalde Portugal V., Aguilera Gómez L. I. Microorganismos y biodiversidad. *Terra Latinoamericana* 1998, 16. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316312> ISSN (Último acceso 24 Agosto 2018).
43. Alemán Weng Z., Díaz Rosa O.E., Molina Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2005, 45(3). Disponible en: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=6fa25746-2155-4159-9e6f-928ae453a6b5%40pdc-v-sessmgr06> (Último acceso 26 Agosto 2018).
44. Federación Mundial de Colecciones de Cultivo. *Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*. WFCC. https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos (último acceso 25 Octubre 2018).
45. Ribbons DW. *Methods in microbiology*. Vol 3. Newport: J.R. Norris Academic Press; 1970.
46. Finegold SM, Martin WJ. *Diagnostico Microbiológico*. 6ª Ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 1983.
47. García P, Fernández M, Paredes F. *Microbiología Clínica Aplicada*. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. México: 1998.
48. Pollitt EJG, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ. Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLoS Pathog*, 14(6). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112> (Último acceso 03 Octubre 2018).

NOTA: De la imagen 12 a la 45 fueron tomadas por mí, durante el transcurso de los 6 meses de realización del proyecto experimental.